

BRAGANTIA

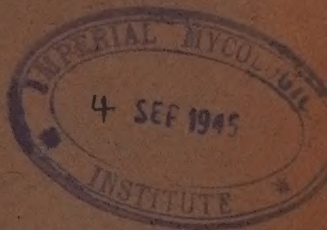
Boletim Técnico da Divisão de Experimentação e Pesquisas
INSTITUTO AGRONÔMICO

Vol. 4

Campinas, Julho de 1944

N.º 7

Sumário



Observações citológicas em Citrus

II — Variedades triplóides

C. A. Krug e O. Bacchi

III — Megasporogênese, fertilização e poliembrião

Oswaldo Bacchi

IV — Números de cromossomos na sub-família Aurantioideae com referência especial ao gênero Citrus

C. A. Krug

V — Poliploidia em relação à densidade e ao tamanho dos estomas em Citrus e outros gêneros das Aurantioideae

C. A. Krug e O. Bacchi

Quimeras periclinais Diplóides-Tetraplóides surgidas em forma de variações somáticas em Citrus

H. B. Frost e C. A. Krug

Secretaria da Agricultura, Indústria e Comércio do Est. de S. Paulo

Departamento da Produção Vegetal

CAIXA POSTAL, 28 — CAMPINAS

Estado de São Paulo — Brasil

DEPARTAMENTO DA PRODUÇÃO VEGETAL

SUPERINTENDENTE: — Teodureto de Camargo

DIVISÃO DE EXPERIMENTAÇÃO E PESQUISAS

Instituto Agrônômico

DIRETOR: — F. Febeliano da Costa Filho

SUBDIVISÕES

SUBDIVISÃO DE GENÉTICA: — C. A. Krug.

Secção de Genética: — C. A. Krug, Constantino Fraga Júnior, Luiz Aristeu Nucci, Osvaldo da Silveira Neves, Alvaro Santos Costa, Luiz O. T. Mendes, Mário Vieira de Moraes, Luiz Paolieri, Reinaldo Forster, Emílio B. Germek, Célio Novais Antunes.

Secção de Citologia: — A. J. Teixeira Mendes, Osvaldo Bacchi, Francisco Juliano Filho, Cândida Helena Teixeira Mendes.

Secção de Introdução de Plantas Cultivadas: — Alcides Carvalho.

SUBDIVISÃO DE HORTICULTURA: — Sílvio Moreira.

Secção de Citricultura e Frutas Tropicais: — Sílvio Moreira, Otávio Galli, Otávio Bacchi, João Ferreira da Cunha, Carlos Roessing.

Secção de Olericultura e Floricultura: — Felisberto C. Camargo (chefe efetivo) Olímpio Toledo Prado (chefe substituto), H. P. Krug, Leocádio Sousa Camargo.

Secção de Viticultura e Frutas de Clima Temperado: — J. Santos Neto, Orlando Rigitane.

SUBDIVISÃO DE PLANTAS TEXTÉIS: — Ismar Ramos.

Secção de Algodão: — Ismar Ramos, Rui Miller Paiva, Valter Schmidt, Mário Decourt Homem de Melo, Valter Lazzarini, Edmur Seixas Martinelli.

Secção de Plantas Fibrosas: — J. M. de Aguirre Júnior, Clovis de Moraes Piza.

SUBDIVISÃO DE ENGENHARIA RURAL: — André Tosello.

Secção de Mecânica Agrícola: — André Tosello, Armando Foá, Fábio de Paula Machado, Lauro Ruppe.

Secção de Irrigação, Drenagem e Defesa Contra a Inundação: — Luiz Cerne, Nelson Fernandes, Rino Tosello, João B. Sigaud, Hernani Godói.

Secção de Conservação do Solo: — J. Quintiliano A. Marques.

SUBDIVISÃO DE ESTAÇÕES EXPERIMENTAIS: — Paulo Cuba.

BRAGANTIA

Assinatura anual, Cr. \$ 50,00 — Número avulso, do mês, Cr. \$ 6,90.

Para agrônomos 50% de abatimento.

Tôda correspondência deve ser dirigida à Redação de BRAGANTIA — Caixa Postal, 28
CAMPINAS — Est. de São Paulo — BRASIL.

BRAGANTIA

Boletim Técnico da Divisão de Experimentação e Pesquisas

INSTITUTO AGRONÔMICO

Vol. 4

Campinas, Julho de 1944

N.º 7

OBSERVAÇÕES CITOLÓGICAS EM CITRUS

II. Variedades triplóides (*)

C. A. Krug

Osvaldo Bacchi

INTRODUÇÃO

As Secções de Citricultura, Genética e Citologia do Instituto Agrônomo, a Estação Experimental de Limeira do mesmo Instituto e a Cadeira de Cito-Genética da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" elaboraram, em 1937, um programa de investigações com *Citrus*, que compreende numerosas pesquisas sobre taxonomia, fisiologia, citologia, genética e melhoramento.

Como parte do programa a ser executado pela Secção de Citologia foi decidido fazer-se um exame detalhado da constituição cromossômica de todas as espécies e variedades de *Citrus* existentes na coleção da Estação Experimental de Limeira. Em um trabalho preliminar, o segundo dos autores apresentou os resultados de uma parte destas determinações (1); como era esperado, a maioria das espécies e variedades examinadas têm $2n=18$, sendo $x=9$ o número básico dos cromossômios, para o gênero, o que está de acordo com as contagens anteriores realizadas por Frost (2), Longley (7), Kandelaki (5), Lapin (6) e Nakamura (11). Uma variedade, entretanto, a "Tahiti Lime", revelou ser triplóide ($2n=27$) e uma outra, ainda não determinada, hipertriplóide ($2n=28$). Na progênie desta última foram constatadas duas plantas, uma com 33 e outra com 21 cromossômios somáticos.

Na primavera de 1941 o primeiro dos autores fez novas investigações citológicas na "Citrus Experiment Station" em Riverside, Califórnia, tendo encontrado mais uma variedade triplóide. Após a publi-

(*) Tradução do original publicado em "The Journal of Heredity" 34 (9) : 277-283. 1943.

cação do trabalho acima mencionado (1), foram levadas a efeito, no Instituto Agrônomo, várias outras determinações do número de cromossômios na progênie do triplóide e também investigações sobre a meiose do mesmo triplóide. No presente trabalho serão apresentadas tôdas as informações até agora existentes sobre esta forma poliplóide de *Citrus*.

TRIPLOIDIA E HIPERTRIPLOIDIA EM *CITRUS*

Revisão da literatura

Excetuando-se as constatações de Bacchi (1), a triploidia em *Citrus* somente tem sido encontrada em híbridos artificiais. O primeiro triplóide artificial em *Citrus* foi feito por Swingle, polinizando a *Fortunella Hindsii*, um "kumquat" tetraplóide (7) que é bastante produtivo e nativo nas montanhas do sudeste da China, com um "limequat" diplóide (*Citrus aurantifolia* x *Fortunella margarita*). Como se esperava, três híbridos resultantes deste cruzamento foram encontrados por Longley (8) como sendo triplóides; eles são constituídos por plantas vigorosas, denominadas "procimequats", que, com apenas alguns anos de idade (16), já florescem e frutificam abundantemente. Longley esteve especialmente interessado na constituição citológica deste híbrido e no comportamento dos seus cromossômios na meiose. Na primeira metáfase, foram geralmente encontrados 13 bivalentes e um univalente; outras vezes os cromossômios se juntavam em grupos polivalentes, ou então um número maior de univalentes aparecia em diaquinese; muitas vezes não era possível distinguir os cromossômios bivalentes dos trivalentes.

As tétrades eram, em geral, anormais, contendo freqüentemente cinco ou seis microsporos, sendo também anormal o pólen maduro. Frost (3) menciona a formação esporádica de híbridos triplóides, quando se cruzam variedades diplóides de *Citrus*, ocorrência que se explica pela duplicação do número de cromossômios, provavelmente durante a formação do nucelo. Trivalentes são usualmente formados na primeira divisão meiótica, juntamente com bivalentes e univalentes; devido a estas irregularidades, os microsporos de cada microsporocito são variáveis em tamanho e número.

Lapin (6) relata sobre a constituição citológica de 6524 "seedlings" de *Citrus* do seu projeto de hibridação, entre os quais se encontraram 118 poliplóides inclusive triplóides, tetraplóides, um hipertriplóide e um hexaplóide. O aparecimento de "seedlings" triplóides é explicado pela produção de grãos de pólen com $2n$ ou de células-ovo não reduzidas; no cruzamento *C. limon* x *C. paradisi* foram encontrados tri-

plóides numa percentagem de 6,67%. O hipertriploíde ($2n=28$) era um híbrido entre duas variedades de limão (*C. limon* x "Meyer Chinese Lemon"). É interessante notar que Luss (9) também relata a constatação de uma planta hipertriploíde, com 28 cromossômios somáticos, derivada de um cruzamento entre o "Novoafon lemon" e o "Meyer Chinese lemon", provavelmente o mesmo usado por Lapin (7) no seu trabalho de hibridação. Infelizmente, nada se conhece a respeito da constituição citológica deste "Chinese Lemon", usado como agente polinizador por ambos os autores.

No capítulo seguinte discutir-se-á detalhadamente a triploidia em *Citrus aurantifolia* Swingle.

DESCRIÇÃO DAS FORMAS CÍTRICAS TRIPLÓIDES

Citrus aurantifolia Swingle

De acôrdo com Hume (4) e Webber (21) esta espécie de *Citrus* compreende um grupo de plantas extremamente variáveis, principalmente com relação aos caracteres dos seus frutos. Inclue tipos com suco ácido e doce, podendo o primeiro deles apresentar casca aderente ou solta. As limas verdadeiras somente são constituídas por algumas variedades do chamado grupo "Mexicano", que produzem frutos pequenos de casca amarela, com sementes, e suco ácido. Segue-se, em importância econômica, o grupo das limas de frutos grandes, no qual as variedades "Tahiti" e "Bearss" são mais conhecidas devido à falta de sementes e ainda por apresentarem diversos outros caracteres favoráveis.

A "Tahiti lime"

Origem e caracteres morfológicos gerais. Esta variedade foi descrita em detalhe por Hume (4) e Webber (21, 22, 23). Supõe-se ter sido originada de semente de limas comuns importadas pelos Estados Unidos, de Tahiti.

Na Estação Experimental de Limeira as árvores desta variedade, derivadas de plantas importadas dos Estados Unidos, possuem copas largas e relativamente baixas. A folhagem é abundante e verde-escura, possuindo as folhas pecíolos levemente alados; os espinhos são pequenos. A produtividade é satisfatória. As flores são normais, com a exceção de suas anteras brancas ou amareladas, que não são deiscentes, sendo completamente desprovidas de pólen (10, 19). Os frutos representados na fig. 1, típicos desta variedade, são ovais com um compri-

mento médio de cerca de 68 mm. Eles contêm muito suco, apresentam casca de cor amarela, típica dos limões, sendo persistente o estilo. Muitos frutos são completamente desprovidos de sementes; examinando-se um total de 100 frutos, na Estação Experimental de Limeira, apenas 34 sementes foram encontradas. Uma deficiência semelhante de sementes foi verificada por Moreira e Gurgel (10), ou seja uma média de 0,2 a 0,4 sementes por fruto.

Meiose e causa da falta de sementes. A falta de sementes nesta variedade tem sido discutida por diversos investigadores. Uphof (19) sugeriu que a falta de grãos de pólen e sacos embrionários normais é devida a uma desintegração precoce dos micro- e megasporocitos, que, aparentemente, não se dividem; ele comparou esta situação com aquela encontrada por Osawa (13) nas laranjas "Washington Navel" e "Satsuma" ("Unshiu mandarin"). Torres (17) também notou a falta de pólen nesta variedade e relacionou este fato com a falta de sementes, não tendo, entretanto, realizado estudos citológicos. Este autor (18) polinizou esta variedade com pólen de Limão Rugoso, não obtendo, porém, semente alguma. Moreira e Gurgel (10) também não conseguiram obter sementes viáveis pela hibridação do "Tahiti lime" e dizem que sementes provenientes de polinizações não controladas, não germinam. Nakamura (11, 12), que realizou extensas contagens de cromossomos no gênero *Citrus*, classificou o "Tahiti lime" como uma forma diplóide normal, afirmando que as células-mãe do grão de pólen degeneram num estado precoce de desenvolvimento, como acontece na laranja "Washington Navel". Finalmente, Bacchi (1) foi o primeiro a demonstrar que esta variedade de *Citrus aurantifolia* Swingle é triplóide ($2n=27$) (Fig. 1). Ele emitiu a hipótese de que a constituição citológica pode ser responsável pela esterilidade masculina e feminina; não foram, entretanto, realizadas observações sobre a meiose.

Determinando o número de cromossomos de várias espécies e variedades de *Citrus*, na "Citrus Experiment Station" em Riverside, Califórnia, o primeiro dos autores confirmou os resultados de Bacchi, tendo constatado a condição triplóide do "Tahiti lime", em pontas de raízes de estacas de um exemplar típico desta variedade (C.E.S. 391; 3A-23-3) existente na coleção daquela Estação Experimental.

Estes resultados não concordam com as constatações de Nakamura (11), que classificou esta variedade como diplóide ($2n=18$); o que nos faz supor que a variedade por ele examinada não era um verdadeiro "Tahiti lime".

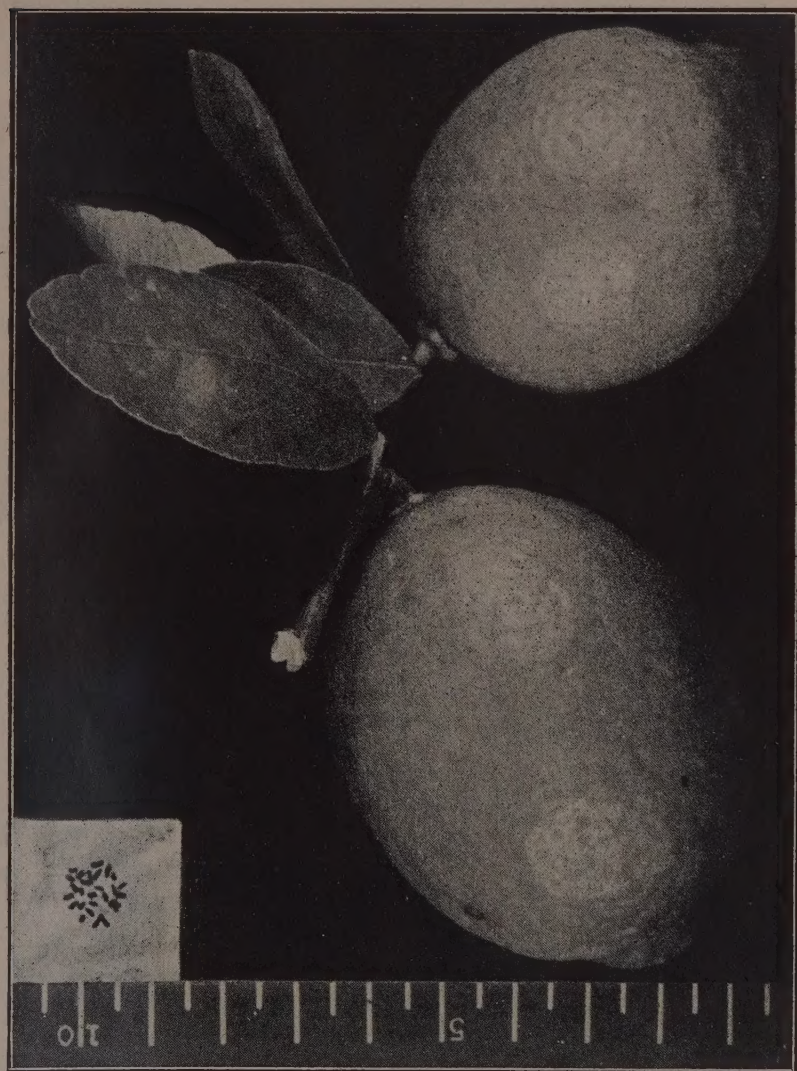


Fig. 1. — Folhas e frutos da variedade triploide "Tahiti lime" (*C. aurantiifolia* Swingle). À esquerda, no alto, microfotografia de uma metáfase somática com $2n=27$, ($\times 2.600$).

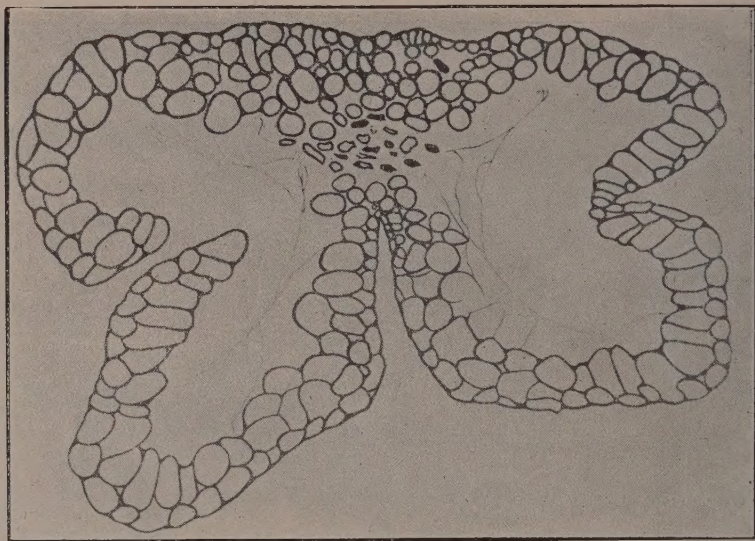


Fig. 2



Fig. 3

- Fig. 2. — Secção transversal em uma antera madura da "Tahiti lime" (x 140).
 Fig. 3. — "Seedlings" da "Tahiti lime": T. L. 5-1 com $2n=20$ e T. L. 5-3 com $2n=19$.
 (Cromosômios x 3.000).
 Fig. 4. — Metáfase somática na variedade "Bearss seedless lime" (*C. aurantifolia* Swingle) com $2n=27$. (x 3.900).

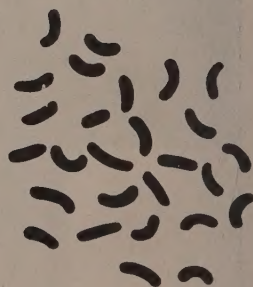


Fig. 4

Acreditamos que esta variedade se tenha originado em forma de um "seedling" de uma das limas diplóides, sendo razoável admitir que a triploidia se deve à fusão de um gameto masculino ou feminino não reduzido, com um haplóide normal.

A-fim-de se determinar se a falta de sementes nesta variedade é devida à sua constituição citológica ou a uma desintegração precoce dos micro- e megasporocitos, provavelmente controlada geneticamente, foram examinados botões florais em vários tamanhos, tanto em esfregaços de carmim-acético, como em seções cortadas ao micrótomo. Este material foi colhido na Estação Experimental de Limeira e na "Citrus Experiment Station", Riverside, Califórnia. Esfregaços de anteras de botões muito novos revelaram a presença de pequenos microsporocitos, mas nenhum foi encontrado em divisão; anteras mais velhas estavam completamente vazias ou continham um número muito limitado de grãos de pólen maduros e de tamanho variável. Seções transversal e longitudinal de anteras maduras revelaram que elas são completamente vazias ou contêm uma pequena porção de tecido comumente desorganizado (Fig. 2).

Baseando-se nestas observações e nos resultados obtidos por Uphof (19), conclue-se que a falta de sementes nesta variedade não é devida à sua natureza triplóide, uma vez que, normalmente, não se verificam divisões meióticas, degenerando, num estado precoce de desenvolvimento, tanto os micro- como os megasporocitos. Considerando-se que alguns poucos grãos de pólen foram encontrados, e, também, que "seedlings" gaméticos (não nucelares) foram obtidos desta lima, como será discutido no capítulo seguinte, torna-se evidente que um número limitado de micro- e megasporocitos escapam à desintegração, ocorrendo as suas divisões meióticas, provavelmente como nos outros triplóides.

Constituição citológica da sua progênie. Como não fôra possível obter sementes de polinizações controladas nesta variedade triplóide, colheram-se, em janeiro de 1940, 54 frutos, de flores polinizadas livremente. Estes frutos forneceram um total de oito sementes, das quais, entretanto, nenhuma germinou. Em junho do mesmo ano, outros 33 frutos foram examinados, dos quais se conseguiram 11 sementes. Duas destas foram eliminadas e, das nove restantes, apenas seis germinaram. Das mudas obtidas, duas morreram ainda muito novas e somente três das sobreviventes forneceram bom material (pontas de raízes) para as determinações cromossômicas. Uma tem 19 e as outras duas, respectivamente, 20 e 21 cromossômios. Considerando-se a falta de pólen nesta variedade e supondo, portanto, que pólen normal com 9 cromossômicos

das plantas circunvizinhas de outras variedades diplóides foi responsável pela formação destes "seedlings", conclue-se que apenas os megasporos com um número de cromossômios próximo a 9 dão origem a sacos embrionários viáveis nesta variedade triplóide.

Como era esperado, as plantas desta progênie são variáveis em tamanho, hábito de crescimento e caracteres foliares (Fig. 3). É interessante notar que nenhum dos "seedlings" examinados é nucelar, sendo todos de origem gamética, como indica a sua constituição cromossômica.

Semelhante comportamento foi verificado por Osawa (13) na laranja diplóide "Washington Navel", cujos micro- e megasporocitos degeneram comumente ao atingirem o estado de tétrade, não produzindo pólen. Este autor mostrou também que são formados, ocasionalmente, sacos embrionários normais, cuja existência talvez explique a ocorrência de muitas sementes contendo embriões viáveis, quando as suas flores são polinizadas com pólen de outras variedades, como também foi recentemente constatado na Estação Experimental de Limeira (10). Nenhuma informação existe, entretanto, que demonstre que os "seedlings" derivados de tais sementes são de origem gamética ou do tipo nucelar. É possível que o desenvolvimento deste último tipo seja estimulado pela polinização cruzada.

"Bearss Seedless Lime"

Origem e caracteres morfológicos gerais. De acôrdo com Hume (4) esta variedade é "evidentemente uma forma da Tahiti" e Webber (21, 22, 23) afirma que ela se originou de um "seedling" desta variedade, tendo caracteres semelhantes, com exceção do crescimento mais ereto dos seus ramos e dos seus frutos que são ligeiramente menores. Estudos comparativos detalhados foram feitos pelo primeiro dos autores deste trabalho, nas variedades "Bearss" e "Tahiti", na "Citrus Experiment Station", Riverside, Califórnia, onde elas crescem lado a lado. Não foram encontradas diferenças apreciáveis nos caracteres da planta, das folhas e dos frutos, sendo muito provável, portanto, que a "Bearss" seja um "seedling" nucelar da "Tahiti lime". Assim sendo, estas duas variedades deveriam ser idênticas na constituição citológica e genética.

Meiose e causa da falta de sementes. Ao que parece, ainda não haviam sido realizadas investigações citológicas nesta variedade, a-fim-de se determinar a causa da sua falta de sementes. Estacas de uma planta desta variedade (C.E.S. — 564; 3A-26-3) foram, portanto, enraizadas em areia na "Citrus Experiment Station", Riverside, Califórnia, na primavera de 1941. As contagens de cromossômios efetuadas

em pontas de raízes revelaram que esta variedade é, também, de constituição triploide ($2n=27$) ; (Fig. 4). Esta constatação constitui outra indicação de que esta variedade se originou de um "seedling" nucelar da Tahiti.

Botões florais de diversos tamanhos, colhidos da planta acima mencionada, foram estudados em preparações de carmim-acético, observando-se os mesmos resultados verificados na "Tahiti lime". Em algumas anteras foram constatados grupos de pequenos microsporocitos, aparentemente normais, enquanto que, em outras preparações, os microsporocitos se apresentavam anormais e disformes. Divisões meióticas não puderam ser vistas, a despeito da presença, em anteras maduras, de alguns grãos de pólen pequenos e degenerados.

Conclue-se, portanto, que a causa da sua falta de sementes é antes genética do que citológica, como foi observado para a "Tahiti lime", da qual se supõe se tenha originado.

IMPORTÂNCIA DA TRIPLOIDIA PARA O MELHORAMENTO DAS PLANTAS CÍTRICAS

Até a presente data, a poliploidia não tem tido particular importância na hibridação das plantas cítricas. Novas variedades comerciais têm aparecido tanto pelas variações somáticas, que são facilmente propagadas pela enxertia, como pela hibridação. O último processo, conforme afirma Frost (3), não tem dado bons resultados quando se cruzam variedades muito próximas de uma mesma espécie ou espécies semelhantes. Híbridos entre espécies não relacionadas e espécies pertencentes a gêneros distintos têm demonstrado, em muitos casos, grande vigor e alta produtividade, como os "tangelos", "citranges", "limequats", etc., conseguidos por Webber e Swingle (23), Webber (20, 22, 24), Swingle, Robinson e Savage (14). Alguns híbridos trigenéricos são vigorosos e produtivos, entre os quais os "citrangquats", descritos por Swingle e Robinson (15). De acordo com Frost (3), cruzamentos entre variedades de *Citrus reticulata* Blanco têm sido bem sucedidos na produção de novas variedades de importância comercial.

Quanto à importância da poliploidia nos trabalhos de melhoramento das plantas cítricas, pode-se afirmar que os tetraplóides são comumente inferiores aos diplóides. O seu crescimento é vagaroso, as plantas são menores e menos eretas; são comumente menos produtivas, com frutos de menor valor comercial, em vista da casca ser mais grossa e da estrutura interna ser mais fibrosa. Os triploides originados pela

hibridação têm sido descritos como sendo semelhantes, em aparência, aos tetraplóides; a maioria parece ser relativamente improdutivo, sendo que os seus frutos, ou são desprovidos de sementes ou possuem uma quantidade menor do que a maioria dos diplóides.

As limas "Tahiti" e a "Bearss", descritas no presente trabalho, parecem ser as primeiras variedades triplóides de *Citrus* de importância econômica. Apesar da sua constituição citológica, elas são altamente produtivas, possuindo frutos maiores que as limas comuns, das quais se derivam; além de conterem muito suco, os seus frutos apresentam casca fina e são quase completamente sem sementes. Considerando as ótimas qualidades destas limas, e admitindo que, como os outros triplóides, também seriam desprovidas de sementes, mesmo que os seus micro- e megasporócitos não se desintegrassem, conclui-se que a sua constatação é de especial importância para os trabalhos de melhoramento das plantas cítricas. A síntese de novos triplóides deveria ser, portanto, estimulada, uma vez que ficou demonstrado agora que tais poliplóides podem ser de grande importância econômica.

RESUMO

No presente trabalho apresenta-se um breve resumo dos conhecimentos atuais sobre a citologia do gênero *Citrus*; descrevem-se, a seguir, duas variedades triplóides de interesse econômico. Admite-se que uma delas se tenha derivado da outra por meio de um "seedling" nucelar. Os caracteres morfológicos e citológicos destes triplóides são apresentados em detalhes. Chama-se a atenção para a importância da triploidia nos trabalhos de melhoramento das plantas cítricas.

S U M M A R Y

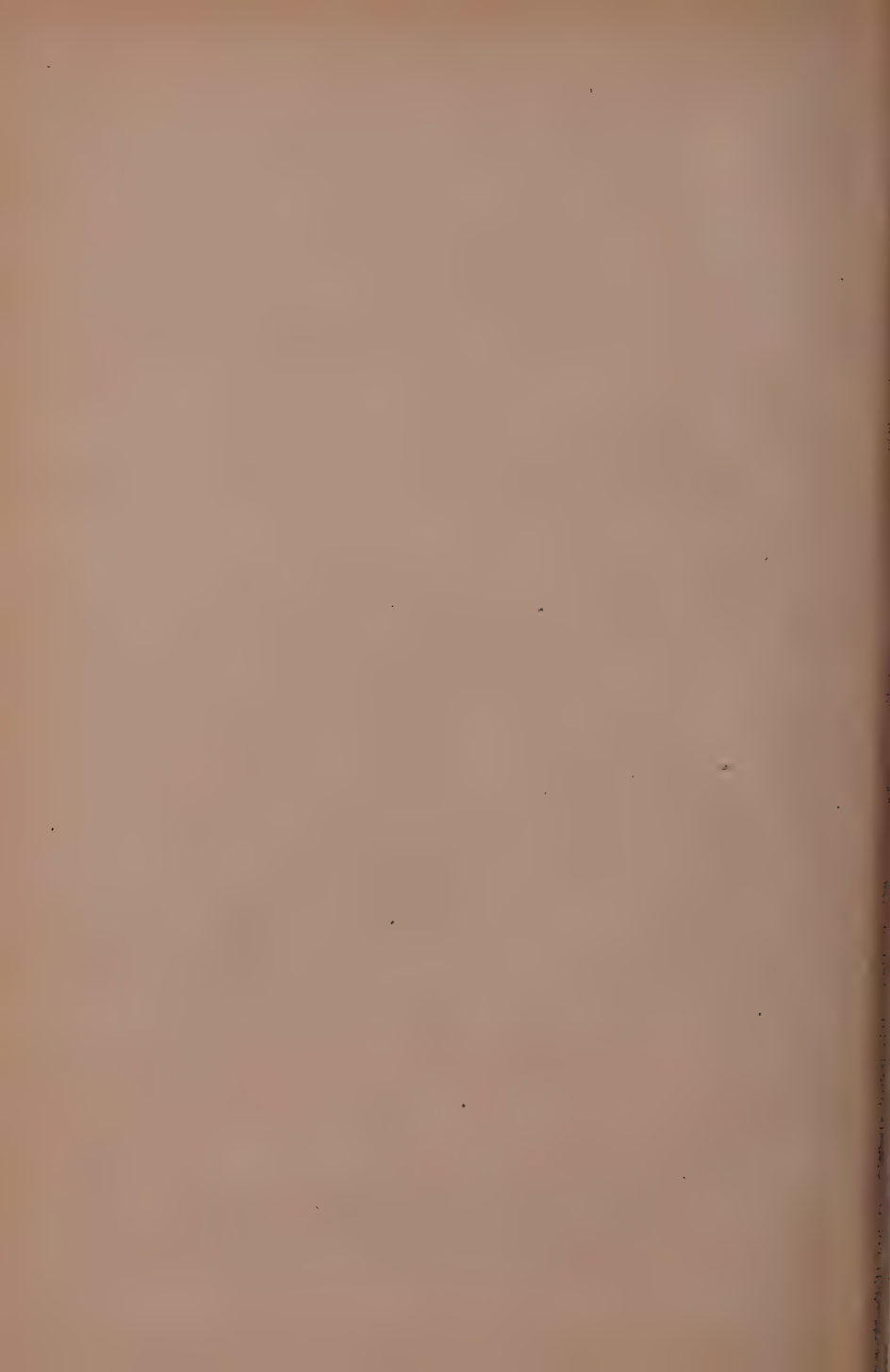
A review is presented of citrus cytology and account is given of the author's investigations of this subject. Two triploid citrus varieties are described which are of economic importance. It appears probable that one of these is a nucellar seedling derived from the other. The morphological and cytological characteristics of these triploids are given in detail.

Attention is called to the importance of triploidy in citrus breeding.

LITERATURA CITADA

1. **Bacchi, O.** Observações Citológicas em Citrus. I. Número de cromossomos de algumas espécies e variedades. *Jornal de Agronomia* 3 (4): 249-258. 1940.
2. **Frost, H. B.** The chromosomes of Citrus. *Jour. Wash. Acad. Sc.* 15: 1-3. 1925.
3. **Frost, H. B.** The genetics and cytology of Citrus. Bungalow, India. *Special Number on Genetics*, pp. 24-27. 1938.
4. **Hume, H. H.** The cultivation of Citrus fruits. Macmillan Corp., New York. 1938

5. **Kandelaki, G. V.** Karyological investigation of some cultivated species and varieties of the genus *Citrus*. *Trav. Int. Bot. Tbilissi* 4 : 109-120. 1938. (Cit. Plt. Breed. Abstr. 9 : 465. 1938).
6. **Lapin, W. K.** Investigation on polyploidy in *Citrus*. *USSR All Union Scient. Res. Inst. Humid Subtrop.* 1 (4) : 1-68. 1937.
7. **Longley, A. E.** Polycary, Polyspory and polyploidy in *Citrus* and *Citrus* relatives. *Jour. Nat. Acad. Sc.* 15 : 347-351. 1925.
8. **Longley, A. E.** Triploid *Citrus*. *Jour. Wash. Acad. Sc.* 16 : 543-545. 1926.
9. **Luss, A. I.** *Citrus* introduction and selection in the USSR. *Soviet Subtropics* N.º 11 (15) : 17-27. 1935. (Cit. Plt. Breed. Abstr. 6 (4) : 1372. 1935).
10. **Moreira, S. e J. T. A. Gurgel.** A fertilidade do pólen e sua correlação com o número de sementes, em espécies e formas do gênero *Citrus*. *Bragantia* 1 : 669-711. 1942.
11. **Nakamura, M.** A preliminary report on the chromosome number, pollen sterility, and the formation of abnormal pollen tetrads in *Citrus*. *Bull. Kagoshima Coll. Agric. and Forestry* 1 : 11-14. 1934.
12. **Nakamura, M.** Cytological studies in the genus *Citrus*. II. The chromosome number, pollen sterility, and the formation of abnormal pollen tetrads. *Studia Citrol.* 6 : 162-178. 1934.
13. **Osawa, I.** Cytological and experimental studies in *Citrus*. *Jour. Coll. Agric. Univ. of Tokio* 4 : 83-116. 1912.
14. **Swingle, W. T., T. R. Robinson e E. M. Savage.** New *Citrus* hybrids. U. S. Dept. Agric. Circular 181. 1931.
15. **Swingle, W. T. e T. R. Robinson.** Two important new types of Citrous hybrids for the home garden : Citrangequats and limequats. *Jour. Agric. Research* 23 : 229-238, 5 pls. 1923.
16. **Swingle, W. T.** The Botany of *Citrus* and its wild relatives. In Webber, H. J. et al. : *The Citrus Industry*, Vol. I, Cap. IV. University of California Press, Berkeley, 1943.
17. **Torres, J. P.** Progress report on *Citrus* hybridization. *Philip. Jour. Agric.* 3 (3) : 217-229. 1932.
18. **Torres, J. P.** *Citrus* hybridization in the Philippines. *Philip. Jour. Agric.* 9 (2) : 161-176. 1938.
19. **Uphof, J. C. Th.** Wissenschaftliche Beobachtungen und Versuche an Agrumen. I. Ueber die Blutenverhältnisse der Tahiti-limonelle. *Gartenbauwiss.* 4 (6) : 513-520. 1931.
20. **Webber, H. J.** Yearbook U. S. Dept. Agric. for 1906. 329-346, pls. 17-21. 1907.
21. **Webber, H. J.** Limes. Mimeogr. Paper of *Citrus* Exp. Sta., Riverside, Calif. 1940.
22. **Webber, H. J.** *The Citrus Industry*. Vol. I, Cap. III. University of California Press, Berkeley, 1943.
23. **Webber, H. J. e W. T. Swingle.** Yearbook U. S. Dept. Agric. for 1904. 221-240. 1905.



OBSERVAÇÕES CITOLÓGICAS EM CITRUS (*)

III. Megasporogênese, fertilização e poliembrionia (**)

Oswaldo Bacchi

INTRODUÇÃO

Apresentamos neste trabalho uma revisão sobre a megasporogênese e a embriologia em *Citrus* e demonstramos, por meios citológicos, a existência de um novo tipo de poliembrionia ainda não descrito para este gênero.

Strassburger (10) foi o primeiro a realizar uma investigação citológica detalhada sobre o gênero *Citrus*; êle não só descreveu o fenômeno da micro e megasporogênese, fertilização e formação do endosperma, como também explicou a origem dos embriões adventícios ("sporophytic polyembryony"), primeiramente descobertos por Leeuwenhoek, em 1719. Trabalhando com *Poncirus trifoliata* e as variedades "Unshiu" (*C. nobilis* Lour.) e "Washington Navel" (*C. sinensis* Osbeck), Osawa (6) chegou às mesmas conclusões de Strassburger com relação à formação dos embriões adventícios, que foram demonstrados como sendo originários de células nucelares circunvizinhas ao saco embrionário.

Frost (4, 5) encontrou, entre 1200 híbridos, 10 casos em que dois "seedlings" híbridos aparentemente idênticos provinham de uma mesma semente; para explicar a origem de tais gêmeos propôs a hipótese da "poliembrionia por clivagem". Casos semelhantes foram encontrados por Traub e Robinson (14); de 782 sementes de um cruzamento entre limão (*C. limon* (Linn.) Burm.) e *Poncirus trifoliata*, 16 produziram dois "seedlings" híbridos, uma produziu três e, uma outra, quatro híbridos; os autores afirmam que híbridos gêmeos foram também encontrados por Swingle, em 1909.

(*) Tradução do original publicado em "The Botanical Gazette" 105 (2) : 221-225. 1943.

(**) O presente trabalho constitui o terceiro da série referente às investigações sobre *Citrus*, efetuados, em colaboração, pelo Instituto Agrônômico e a Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz".

A poliembrionia em *Citrus* e gêneros afins (*Poncirus* e *Fortunella*) tem sido também investigada, sob diversos aspectos (9, 12, 13, 15, 16 e 17), e uma revisão do assunto foi apresentada por J. M. Webber (18). Até a presente data, somente dois tipos de poliembrionia eram conhecidos neste grupo de gêneros — nucelar e por clivagem — este último causado pela suposta bipartição do embrião sexual.

Material e métodos. O material foi colhido na Estação Experimental de Limeira, do Instituto Agrônômico, de árvores representativas de duas espécies: pomelo (grapefruit) Foster (*C. paradisi* Macf.) e laranja azêda (*C. aurantium* L.).

Para o estudo da megasporogênese, foram colhidos ovários de botões em diferentes estados de desenvolvimento e de flores recentemente abertas; para as outras observações foram colhidos, de tempo a tempo, ovários de flores emasculadas nas vésperas da antese e polinizadas artificialmente 4 dias após a castração.

A fixação dos ovários, que eram dissecados para a melhor penetração do líquido fixador, foi feita com "Craf" (7); depois de 24 horas, o material era lavado em álcool a 70%, desidratado pelo método do álcool butílico e incluído em parafina. As secções foram feitas com uma espessura de 10-25 micra e coloridas em hematoxilina de "Heidenhain".

OBSERVAÇÕES

Megasporogênese. A célula-mãe dos megasporos dá origem a uma tétrede linear, da qual os três megasporos micropilares degeneram e o chalazal se desenvolve, dando formação ao megagametófito normal (figs. 1-6). Não existem diferenças entre as duas espécies estudadas, cujos megagametófitos se apresentam com os seguintes caraterísticos: 1) duas sinérgidas bem desenvolvidas e colocadas nas proximidades da micrópila; 2) a oosfera localizada entre as sinérgidas, um pouco mais distante da micrópila; dada a semelhança com as primeiras, as suas inclusões citoplasmáticas constituem o principal ponto de diferenciação entre as mesmas; 3) dois núcleos polares, situados mais ou menos no centro do megagametófito, os quais geralmente permanecem separados até a fertilização, podendo, no entanto, fundir-se um pouco mais cedo; 4) as três antípodas, bem menores do que as sinérgidas, que podem ser mais facilmente observadas em megagametófitos recentemente formados, em vista da sua duração geralmente efêmera.

Em regra geral, a primeira divisão meiótica ocorre quando o óvulo ainda não se encontra completamente desenvolvido (fig. 1); a formação

do megagametófito é completada no dia da abertura das flores (fig. 6) ou um pouco antes. No mesmo ovário são encontrados, comumente, megasporocitos e megagametófitos em diferentes estados de desenvolvimento.

Fertilização. Strassburger (10) e Osawa (6) afirmaram que a fertilização ocorre geralmente 4 semanas após a polinização. Observamos, entretanto, no pomelo Foster, que o período entre a polinização e a fertilização é, em média, de quatro dias. Êste fato vem em apóio às conclusões de Coit (3), de que "o tempo exigido para a completa fertilização após a polinização varia com as variedades: de trinta horas na laranja "Satsuma" para quatro semanas no *Poncirus trifoliata*".

O tubo polínico entra no megagametófito através da micrópila, desorganizando, comumente, uma das sinérgidas; algumas vêzes, ambas desaparecem nessa ocasião, e em raros casos, as duas permanecem intactas.

As sinérgidas ou antípodas, que ainda persistam no megagametófito após a fertilização, degeneram mais ou menos rapidamente, enquanto que a célula-ovó inicia um período de repouso relativamente longo, de mais ou menos 50 dias. Osawa (6) observou, em *Poncirus trifoliata*, um repouso de 3 a 4 semanas.

O núcleo primário do endosperma, formado pela fusão dos núcleos polares com um dos núcleos reprodutivos do tubo polínico, sofre uma série de divisões sucessivas, logo após a sua formação; os núcleos resultantes dessas divisões permanecem esparsos pelo citoplasma, sem formação de paredes celulares. Origina-se, assim, um endosperma nuclear (figs. 7 e 11).

Nos ovários mais idosos (com 67 dias após a polinização), por nós examinados, foram observados mais de 1500 núcleos, que ainda permaneciam livres no citoplasma; não chegamos, portanto, a examinar os posteriores estados de desenvolvimento do endosperma, onde se devem realizar as formações de paredes celulares e as subseqüentes divisões celulares, já constatadas por Osawa (6) e Strassburger (10).

Poliembrionia. Quando as primeiras divisões do zigote ocorrem para formar o embrião sexual, diversas células nucelares (fig. 10), circunvizinhas ao saco embrionário e geralmente próximas à micrópila, já iniciaram, através de uma série de divisões, a formação dos embriões adventícios (figs. 10-12). Ainda não completamente desenvolvidos, êstes embriões já se acham localizados na cavidade do saco embrionário. Tal processo, já detalhadamente descrito por Strassburger (10), Osawa (6) e outros, foi observado em ambas as variedades estudadas.



Figs. 1-8 — Fig. 1, pomelo Foster: megasporocito em prófase; ovário de botão pequeno. Fig. 2, pomelo Foster: dois megasporos; ovário de botão pequeno. Fig. 3, laranja azêda: quatro megasporos, três dos quais em degenerescência; ovário de botão grande. Fig. 4, pomelo Foster: megagametófito com dois núcleos; ovário de botão grande. Fig. 5, pomelo Foster: megagametófito tetra-nucleado; ovário de botão grande. Fig. 6, pomelo Foster: megagametófito completo; ovário no dia da abertura da flor. Fig. 7, pomelo Foster: célula-ovo no período de repouso e endosperma com 8 núcleos; ovário com 15 dias após a polinização. Fig. 8, pomelo Foster: desenho à câmara clara da fig. 9, incluindo observações feitas em secções adjacentes. Figs. 1-6, 8, x 1000; fig. 7, x 500.

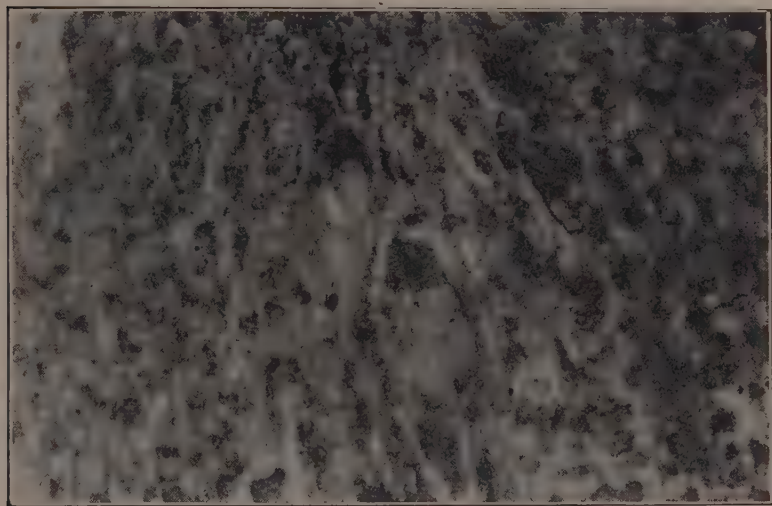


Fig. 9 — Pomelo Foster: desenvolvimento de dois megagametófitos no mesmo óvulo; ovário no dia da abertura da flor (x 700).



Fig. 10 — Pomelo Foster: célula nucelar após a primeira divisão para a formação de um embrião adventício; ovário com 67 dias após a polinização (x 1400).

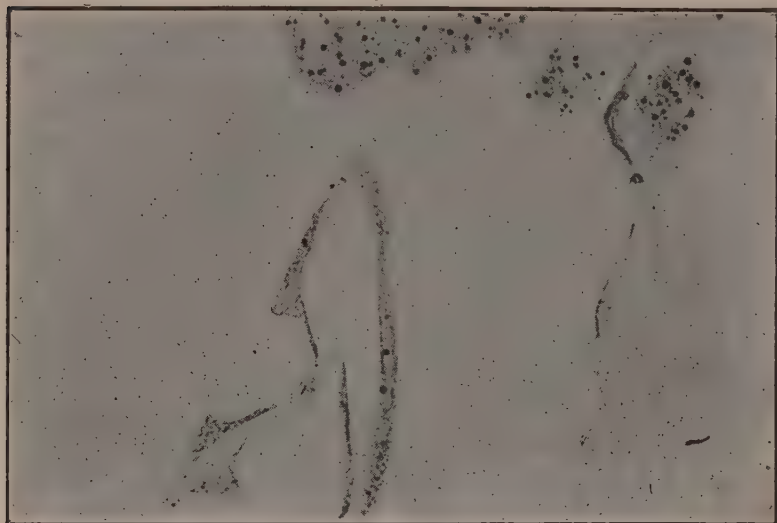


Fig. 11 — Pomelo Foster: embriões nucelares e núcleos do endosperma; ovário com 67 dias após a polinização (x 350).

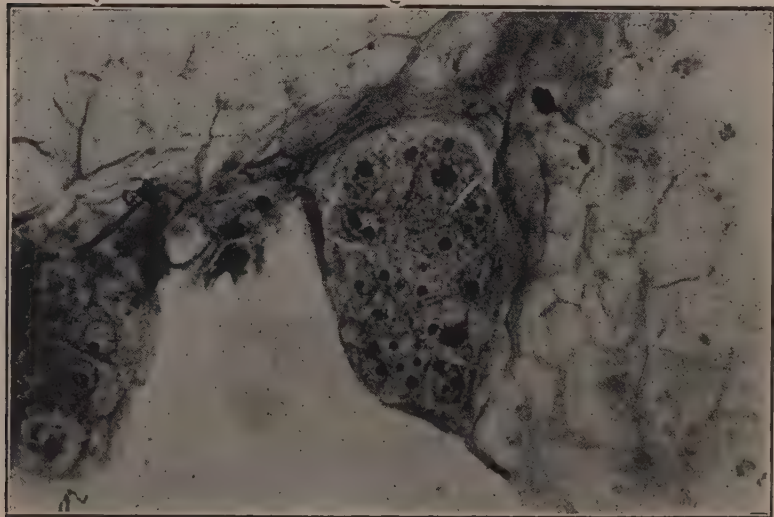


Fig. 12 — Pomelo Foster: detalhe de um embrião nucelar em desenvolvimento; ovário com 67 dias após a polinização (x 700).

Num grande número de óvulos examinados, foram encontrados quatro casos de dois gametófitos desenvolverem-se no mesmo óvulo; a fertilização de suas células-ovo poderia, portanto, ter dado origem ao desenvolvimento de dois embriões sexuais na mesma semente. Diferentes estados de desenvolvimento, de tais gametófitos extras, estão representados nas figuras 8 e 9.

A ocorrência de dois gametófitos, no mesmo óvulo, já foi descrita em diversos outros gêneros: *Hiptage* (11), *Medicago* (8), *Poa* (1) e *Saxifraga* (2). Em *Citrus*, com exceção dos gêmeos híbridos idênticos de Frost (4, 5), não se sabe se os outros grupos de híbridos derivados de uma única semente, como os obtidos por Traub e Robinson (14) e por Swingle, em 1909, são geneticamente idênticos.

Para estabelecer uma hipótese, com relação à origem de gêmeos híbridos, é primeiramente necessário determinar se eles são geneticamente idênticos; se não forem, a ocorrência de dois gametófitos no mesmo óvulo constitui a melhor explicação. Dada a grande improbabilidade da ocorrência de mais de dois gametófitos no mesmo óvulo, o aparecimento de mais de dois "seedlings" híbridos, em uma mesma semente, pode ser atribuído tanto à clivagem, sôzinha, como à combinação deste fenômeno com a existência de dois gametófitos no mesmo óvulo.

SUMÁRIO

É apresentada uma revisão geral da megasporogênese, fertilização, formação do endosperma e poliembryonia em *Citrus*, tendo sido confirmada, pelas observações nas espécies *C. paradisi* Macf. e *C. aurantium* L., a maioria das conclusões feitas por Strassburger (10) e Osawa (6).

É descrita uma nova forma de poliembryonia causada pela existência, em alguns casos, de dois gametófitos num mesmo óvulo; explica-se, deste modo, a origem de dois híbridos não idênticos em uma mesma semente.

Três formas de poliembryonia são, portanto, conhecidas em *Citrus*: a) a poliembryonia nucelar, dando origem a um número variável de "seedlings" "maternais" idênticos e derivados do nucelo; 2) a poliembryonia por clivagem (4, 5), originada pela suposta bipartição do embrião sexual; e 3) a poliembryonia causada pela ocorrência de mais de um gametófito normal no mesmo óvulo.

O endosperma em *Citrus* pertence ao tipo nuclear.

SUMMARY

1. A general review is presented of megasporogenesis, fertilization, endosperm formation and polyembryony in *Citrus*, most of the findings of Strassburger (10) and Osawa (6) having been confirmed through investigation of *C. paradisi* Macf. and *C. aurantium* L.

2. A new form of polyembryony is presented, caused by the existence in some instances of two gametophytes in the same ovule. The origin of two non-identical hybrids from the same seed is thus explained.

3. Three forms of polyembryony are therefore known in *Citrus*. (a) nucellar embryony, giving rise to a variable number of identical, "maternal" seedlings derived from the nucellus; (b) cleavage polyembryony (4, 5) originating through fission of the generative embryo; and (c) polyembryony caused by the occurrence of more than one normal gametophyte in the same ovule. The endosperm in *Citrus* is free.

LITERATURA CITADA

1. Akerberg, Erik. Apomictic and sexual seed formation in *Poa pratensis*. Hereditas **25** : 359-370. 1939.
2. Chapman, Marjorie. The ovule and embryo sac of *Saxifraga virginensis*. Amer. Jour. Bot. **20** : 151-158. 1933.
3. Coit, J. Eliot. Citriculture. Univ. Calif. Coll. Agr. and Agr. Exp. Sta. Ann. Rept. 105-106. 1913-14.
4. Frost, H. B. Polyembryony, heterozygosis and chimeras in *Citrus*. Hilgardia **1** : 365-402. 1926.
5. Frost, H. B. The genetics and cytology of *Citrus*. Current Sci., Special Number on Genetics 24-27. 1938.
6. Osawa, I. Cytological and experimental studies in *Citrus*. Jour. Coll. Agr. Imp. Univ. Tokyo **4** : 83-116. 1912.
7. Randolf, L. F. A new fixing fluid and a revised schedule for the paraffin method in plant cytology. Stain Technology **10** : 85-86. 1935.
8. Reeves, R. C. Development of the ovule and embryosac of alfafa. Amer. Jour. Bot. **17** : 239-246. 1930.
9. Sokol'skaja, B. P. On polyembryony in seeds of *Citrus*. Soviet Subtropics n. 4 (44) : 66-67. 1938. Cit. Pla. Breed Abstrac. **9** : 444. 1939.
10. Strassburger, E. Ueber Polyembryonie. Jenaische Ztschr. fur Naturw. **12** : 647-667. 1878.
11. Subra Rao, A. M. A note on the development of the female gametophyte of some *Malpighiaceae* and polyembryony in *Hiptage madablota*. Curr. Sci. (Bangalore) **6** : 280-282. 1937.
12. Torres, J. P. Polyembryony in *Citrus* and study of hybrid seedlings. Philip. Jour. Agr. **7** : 37-58. 1936.
13. Traub, Hamilton P. Artificial control of nucellar embryony in *Citrus*. Science **83** : 165-166. 1936.
14. Traub, Hamilton P. and T. Ralph Robinson. Improvement of subtropical fruit crops: *Citrus*. Yearbook U. S. Dept. Agr. 794. 1937.
15. Webber, H. J. Complications in *Citrus* hybridization caused by polyembryony. Science **11** : 308. 1900.
16. Webber, H. J. The influence of pollination on the set of fruit in *Citrus*. Cal. Citrog. XVI : 304. 1930.
17. Webber, H. J. The economic importance of apogamy in *Citrus* and *Mangifera*. Amer. Soc. Hort. Sci. Proc. **28** : 57-61. 1931.
18. Webber, J. M. Polyembryony. Bot. Review **6** : 575-598. 1940.

OBSERVAÇÕES CITOLÓGICAS EM CITRUS

IV. Números de cromossômios na sub-família *Aurantioideae* com referência especial ao gênero *Citrus* (*).

C. A. Krug (**)

INTRODUÇÃO

A sub-família *Aurantioideae* constitui uma das importantes subdivisões das *Rutaceae*, compreendendo, segundo Swingle (26), que elaborou um novo arranjo taxonômico para este grupo, um total de 2 tribus, 6 subtribus, 33 gêneros, 201 espécies e 15 variedades. Compõe-se de tipos que demonstram uma grande variabilidade nos caracteres morfológicos e fisiológicos, variando desde formas xerófitas, como *Eremocitrus glauca* (Lindl.) Swingle, que vegeta em estado selvagem nos desertos da Austrália, possuindo folhas estreitas, pequenas e lineares, até formas bem adaptadas às zonas úmidas dos trópicos, como, por exemplo, as toranjas (*C. grandis* Osbeck), nativas na Malásia e na Polinésia; alguns possuem folhas simples, com asas de tamanho variável nos pecíolos, como, por exemplo, as espécies de *Citrus*; outros se caracterizam por folhas sempre-verdes e compostas, como *Feroniella lucida* Swingle; ainda outros as possuem trifoliadas e decíduas, como *Aegle marmelos* Correa. Os frutos variam desde pequenas bagas, encontradas em *Murræa exotica* L., a grandes hesperídeos, como as bem conhecidas toranjas (*Citrus grandis* Osbeck), que chegam a pesar mais de um kg.

Considerando a grande diversidade dos caracteres deste grupo, dever-se-ia esperar que a sua constituição citológica, principalmente no que diz respeito ao número de cromossômios, também variasse consideravelmente. Pelo contrário, este número se tem revelado relativamente constante para todos os membros, até agora examinados, desta sub-família; o número básico para todos eles é de $x=9$, tendo a maioria das variedades cultivadas $2n=18$.

Strassburger (25) provavelmente foi o primeiro a efetuar investigações citológicas num dos representantes deste grupo, no gênero *Citrus*, concluindo que 8 deveria ser o número haplóide dos seus cromossômios; também Osawa (22) indica este número haplóide como o mais

(*) Tradução, ligeiramente ampliada, da publicação n.º 481 da Citrus Experiment Station, Riverside, Califórnia, cujo original se acha em Botanical Gazette 104 (4): 602-611, 1943.

(**) Investigação feita na Citrus Experiment Station, Riverside, Califórnia, quando o autor era detentor de uma bolsa de estudos oferecida pela John Simon Guggenheim Memorial Foundation, 1941.

provável para este gênero. Todos os outros investigadores, entretanto, principalmente Longley (15, 16), Frost (3-8) e Nakamura (18-20), concordam que 9 é o número básico para este grupo. A incapacidade de Strassburger e de Osawa, de determinar o número exato de cromossomos, deve ser atribuída à técnica defeituosa que utilizaram. Yarnell (33 b), entretanto, observou, às vezes, a associação de 2 ou mais pares de cromossomos em microsporocitos em metáfase, ou mesmo antes, atribuindo a este fato as contagens erradas daqueles dois autores. Com relação à morfologia dos cromossomos, poucas informações existem na literatura. Kandelaki (10), estudando várias espécies de *Citrus* e a *Fortunella margarita* (Lour.) Swingle, fez uma tentativa de classificar os cromossomos metafásicos da mitose somática em três grupos: um caracterizado por cromossomos que possuem dois braços de comprimentos diferentes, um segundo de braços quase iguais e um terceiro possuindo cromossomos apresentando satélites. Yarnell (33 a) também estudou a conformação dos cromossomos somáticos em pontas de raízes da variedade "Meyer" de limão, classificando-os em 7 tipos diferentes, de acordo com o tamanho, comprimento dos "braços" e posição do ponto de inserção do fuso. Das pesquisas efetuadas por vários outros investigadores, inclusive pelo autor do presente trabalho, deduz-se não haver mais dúvida de que, na maioria das espécies e gêneros desta sub-família até agora estudados, existem diferenças apreciáveis entre os seus cromossomos somáticos.

No presente trabalho relata-se o número de cromossomos de vários gêneros, espécies e variedades das *Aurantioideæ* ainda não determinadas anteriormente. O quadro I também inclui todas as determinações encontradas pelo autor na literatura consultada.

MATERIAL E MÉTODOS

As determinações que se seguem foram feitas em material colecionado na Citrus Experiment Station, Riverside, Califórnia, na primavera de 1941. A identificação correta deste material (com exclusão das variedades hortícolas) o autor deve à gentileza do dr. W. T. Swingle, ao qual submeteu material de herbário em Washington, D. C., em 1941. As contagens de cromossomos foram feitas em pontas de raízes obtidas de estacas plantadas, em areia, na estufa; as raízes foram fixadas em Crai (23) e desidratadas pelo método do álcool butílico terciário. As seções, cortadas na parafina, foram coloridas pela hematoxilina de Heidenhain. Algumas determinações também foram feitas em esfregaços de anteras novas, em carmim-acético.

Material não pertencente ao gênero *Citrus*. Contagens de cromossômios foram feitas nos seguintes gêneros:

1. *Clausena lansium* (Lour.) Skeels. (C.E.S. 1460, 7A-7-4; C.P.B. 2904) (*). Êste gênero, nativo na China do Sul, pertence à tribu *Clausenæ*, subtribu *Clauseninæ*, é constituído por árvores grandes, possuindo fôlhas compostas e pinadas; suas flores são brancas e produzidas em grandes panículas; os frutos são pequenos e arredondados. $2n=18$ (fig. 1).

2. *Atalantia citroides* Pierre ex Guill. (C.E.S. 1430, 7A-7-9; C.P.B. 7534). De acôrdo com Swingle, o material estudado também pode pertencer ao *A. monophylla*, pois, infelizmente, não existiam flores que teriam facultado uma identificação específica exata. O gênero *Atalantia* é um dos gêneros da tribu *Citræ*, subtribu *Citrinæ*, sendo caracterizado por fôlhas curtas, estreitas e grossas. $2n=18$ (fig. 2).

3. *Microcitrus* spp. (C.E.S. 1484, 7A-12-2; C.E.S. 1485, 7A-12-3; C.E.S. ?, 7A-14-4). Foram examinadas três espécies na Citrus Experiment Station, duas das quais estavam etiquetadas, como sendo, respectivamente, *M. australasica* var. *sanguinea* e *M. virgata*. A exatidão destas determinações específicas não pôde ser estabelecida. Tôdas elas possuem fôlhas pequenas, obtusas e ovais, e espinhos pontudos, bem característicos dêste gênero. $2n=18$ (figs. 3, 4).

4. *Afraegle gabonensis* (Swingle) Engler (C.E.S. 1432, 7A-8-8; C.P.B. 7516-A). Êste gênero pertence à tribu *Citræ*, subtribu *Balsamocitrinæ*. O exemplar de Riverside é representado por uma árvore pequena, possuindo fôlhas semelhantes às do gênero *Citrus*, sendo, porém, levemente arroxeadas; os seus espinhos são compridos e duros; ao que parece, não floresce no clima da Califórnia. $2n=18$.

Material pertencente ao gênero *Citrus*. As seguintes espécies e variedades de *Citrus*, o grupo mais importante sob o ponto de vista econômico, também possuem $2n=18$:

1. *Citrus aurantifolia* Swingle:

*Lima Kusai (**) (C.E.S. 452, 3A-15-3);

Lima Mexicana — considerada como sendo a espécie "tipo" (C.E.S. 1710, 3A-14-3) (fig. 5);

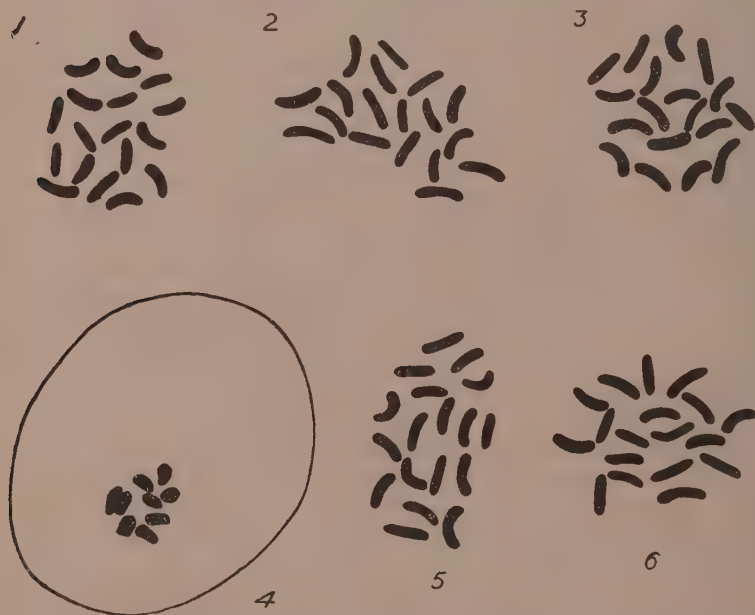
Lima doce da Palestina (C.E.S. 1482, 51A-6-13; C.P.B. 1158).

2. *C. celebica* Koord. var. *southwickii* (Wester) Swingle (C. E. S. 2453, 3A-36-2; C.P.B. 10125) (fig. 6).

(*) Número e localização na Citrus Experiment Station de Riverside (ns. do campo, da parcela, linha e árvore). C. P. B. e S. P. I. representam números do U. S. Department of Agriculture.

(**) Nesta publicação, inclusive no quadro I, os nomes específicos e sub-específicos não considerados válidos por Swingle (28) foram marcados com asteriscos à frente da palavra, o que também foi feito em todos os nomes de variedades hortícolas que, provavelmente, não foram aqui classificadas convenientemente por espécies. (Vide adenda por H. B. Frost, no fim do artigo).

3. *C. hystrix* DC. (C.E.S. 2454, 3A-37-1; C.P.B. 2881).
4. *C. ichangensis* Swingle(*) (C.E.S. 2431, 51A-10-15; C.P.B. 954) (fig. 7).
5. * *C. leocarpia* Hort. nov. var. (possivelmente uma forma de *C. tachibana* (Mak.) (Tan.) (C.E.S. 2448, 7A-8-6; C.P.B. 10280) (fig. 8).
6. *C. limon* (L.) Burm. :
 Limão Lisboa (C.E.S. 584, 51A-4-4);
 *Limão Meyer (C.E.S. 601, 51A-5-15; S.P.I. 23028).
7. *C. macroptera* Montr. (C.E.S. 432, 3A-38-1) (fig. 9).
8. *C. medica* L. :
 Cidra filipina (C.E.S. 757, 3A-8-5) (fig. 10);



- Fig. 1 — *Clausena lansium* (Lour.) Skeels; cromossomos metafásicos. $2n=18$.
 Fig. 2 — *Atalantia citroides* Pierre ex Guill; cromossomos metafásicos. $2n=18$.
 Fig. 3 — *Microcitrus* sp. (possivelmente *australasica* var. *sanguinea*; cromossomos metafásicos. $2n=18$.
 Fig. 4 — *Microcitrus* sp. Primeira metáfase da meiose. $n=9$.
 Fig. 5 — *Citrus aurantifolia* Swingle (Lima mexicana); cromossomos metafásicos. $2n=18$.
 Fig. 6 — *C. celebica* Koord. var. *southwickii* (Wester) Swingle; cromossomos metafásicos. $2n=18$.

¶ (*) A determinação do número de cromossomos nesta espécie por Yarnell (33 d) só se tornou conhecida do autor depois da publicação do original deste artigo.

Cidra italiana (C.E.S. 128, 3B-2-5; S.P.I. 701);

Cidra indiana (C.E.S. 138B-3A-10-2).

9. * *C. Webberi*(*) Wester (C.E.S. 1455, 7A-9-4; C.P.B. 10026) (fig. 11).

Apesar das grandes diferenças nos seus caracteres morfológicos, e do fato de estes gêneros e espécies das *Aurantioideæ* pertencerem a grupos de origens tão diversas, o mesmo número de cromossômios $2n=18$ foi, pois, encontrado em todos eles.

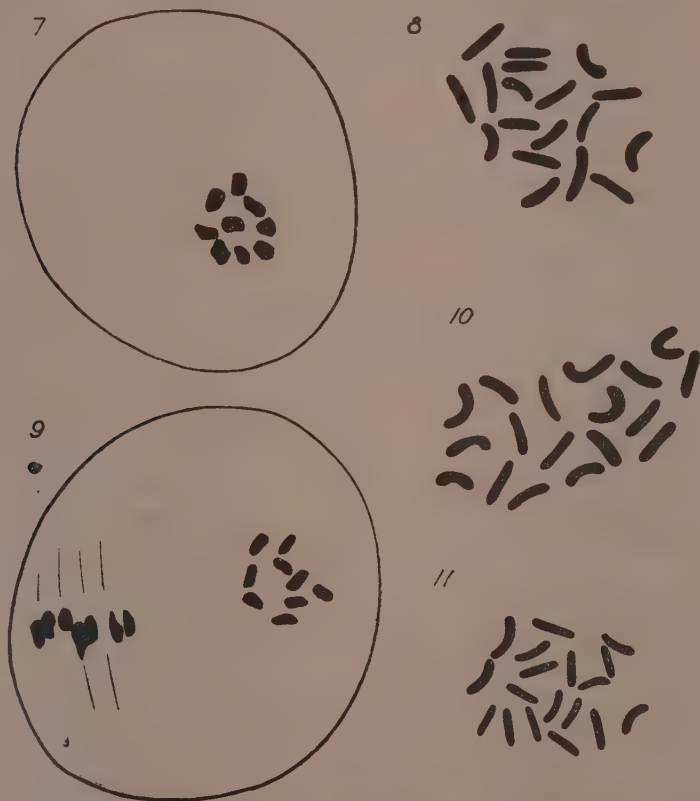


Fig. 7 — *C. ichangensis* Swingle. Primeira metáfase da meiose. $n=9$.

Fig. 8 — **C. leiocarpa* Hort. var. nov. (*C. tachibana* ?); cromossômios metafásicos. $2n=18$.

Fig. 9 — *C. macroptera* Montr. Segunda metáfase da meiose. $n=9$.

Fig. 10 — *C. medica* L. (Cidra filipina). Cromossômios metafásicos. $2n=18$.

Fig. 11 — **C. Webberi* Wester. Cromossômios metafásicos. $2n=18$.

(*) A determinação do número de cromossômios nesta espécie por Yarnell (33 d) só se tornou conhecida do autor depois da publicação do original deste trabalho.

QUADRO I

Números de cromossomos na sub-família das *Aurantioideæ*

MATERIAL	N.º DE CRO- MOSÔMIOS		AUTOR E ANO
	Gamé- ticos	Somá- ticos	
Tribu 1: Clauseneae			
Subtribu 1: <i>Micromelinæ</i>			
<i>Micromelum tephrocarpum</i> (?)	—	18	Yarnell (33 d) 1940
Subtribu 2: <i>Clausenineæ</i>			
<i>Clausena lansium</i> (Lour.) Skeels	—	18	Krug 1943
<i>Murraya paniculata</i> (L.) Jack	9	—	Toxopeus (31) 1933
Tribu 2: <i>Citræ</i>			
Subtribu 1: <i>Triphasiinæ</i>			
<i>Triphasia trifolia</i> (Burn.) P. Wilson	9	—	Longley (15) 1925
(Forma tetraplóide)	18	—	Longley, citado em Traub e Robinson (32) 1937
Subtribu 2: <i>Citrinæ</i>			
<i>Severinia buxifolia</i> (Poir.) Tenore	9	—	Longley (15) 1925
<i>Citropsis schweinfurthii</i> (Engl.) Swing. & M. K.	9	—	Longley (15) 1925
<i>Atalantia citroides</i> Pierre ex Guill (possi- velmente <i>A. monophylla</i> DC)	—	18	Krug 1943
* <i>Fortunella crassifolia</i> Swingle	9	—	Longley (15) 1925
<i>F. Hindsii</i> Swingle (4n)	18	—	Longley (15) 1925
<i>F. Hindsii</i> (2n)	9	—	Longley (27) 1929
<i>F. japonica</i> Swingle	9	—	Longley (15) 1925
<i>F. margarita</i> (Lour.) Swingle	9	—	Longley (15) 1925
* <i>Eremocitrus glauca</i> (Lindl.) Swingle	—	18	Yarnell (33 d) 1940
<i>Poncirus trifoliata</i> (L.) Raf.	9	—	Longley (15) 1925
(Forma tetraplóide)	—	36	Lapin (14) 1937
<i>Microcitrus australis</i> (Planch.) Swing. ..	9	—	Longley, citado em Traub e Robinson (32) 1937
<i>Microcitrus</i> sp.	—	18	Krug 1943
<i>M. virgata</i> (?) (*)	—	18	Krug 1943
<i>M. australasica</i> var. <i>sanguinea</i> (?)	—	18	Krug 1943
<i>Citrus aurantifolia</i> Swingle, limas (três variedades)	9	—	Longley (15) 1925
Lima	9	—	Nakamura (20) 1934
Limão seda	—	18	Bacchi (1) 1940
Rio Claro	—	18	Bacchi (1) 1940
*Lima Rangpur, cravo ou rosa	—	18	Bacchi (1) 1940
*Lima Kusai	—	18	Krug 1943
Lima Mexicana	—	18	Krug 1943
Lima doce da Palestina	—	18	Krug 1943
(3n) Lima Tahiti	—	27	Bacchi (1) 1940

(*) *M. virgata* não constitui um nome válido e tem sido atribuído a uma forma, mais tarde identificada como sendo um híbrido *M. australis* x *M. australasica* (28).

(Continuação)

MATERIAL	N.º DE CRO- MOSÔMIOS		AUTOR E ANO
	Gamé- ticos	Somá- ticos	
Progenie da Lima Tahiti	—	19	Krug e Bacchi (11)
(3n) Lima Bearss	—	20	Krug e Bacchi (11)
<i>C. aurantium</i> L., laranja azêda	—	21	Krug e Bacchi (11)
(Quatro variedades)	—	27	Krug e Bacchi (11)
Laranja azêda ou Agro-Sevilhana	8	—	Strassburger (25) 1907
<i>C. aurantium</i> L.	9	—	Nakamura (20) 1934
<i>C. aurantium</i> , *sub-espécie bergamia (Risso & Poiteau) (Wright & Arn. ?)	—	18	Bacchi (1) 1940
<i>C. celebica</i> Koord. var. <i>southwickii</i> (Wes- ter) Swingle	—	18	Yarnell (33 d) 1940
* <i>C. deliciosa</i> Ten. (tetraplóide)	9	—	Nakamura (20) 1934
* <i>C. depressa</i> Hayata	—	18	Krug 1943
* <i>C. erythrosa</i> Hort. ex Tanaka	—	36	Lapin (14) 1937
* <i>C. genshokan</i> Hort. ex Tanaka	9	—	Nakamura (20) 1934
* <i>C. glaberima</i> Hort. ex Tanaka	9	—	Nakamura (20) 1934
<i>C. grandis</i> Osbeck, Pomelo Frizzelle (*)	9	—	Nakamura (20) 1934
(4n) Pomelo Frizzelle tetraplóide	9	—	Nakamura (20) 1934
Djeroek bali	18	—	Frost (não publicado, 1927)
Sete variedades orientais de pomelos ...	9	—	Frost (7) 1927
<i>C. hystrix</i> DC	9	—	Toxopeus (31) 1933
<i>C. ichangensis</i> Swingle	9	—	Nakamura (20) 1934
* <i>C. inodora</i> (?)	9	—	Krug 1943
* <i>C. junos</i> Sieb. sec. Tanaka, Yuzu e quatro outras variedades	—	18	Yarnell (33 d) 1940
* <i>C. kinokuni</i> Hort. ex Tanaka	9	—	Nakamura (20) 1934
* <i>C. kotokan</i> Hayata (duas variedades) ...	9	—	Nakamura (20) 1934
* <i>C. leiocarpa</i> Hort. (duas variedades) ...	9	—	Nakamura (20) 1934
Nov. var. (possivelmente uma forma de <i>C. tachibana</i> (Mak.) Tan.	9	—	Krug 1943
* <i>C. limetta</i> Risso, Sweet lemon	—	18	Nakamura (20) 1934
Lemon-shaped lumia	9	—	Nakamura (20) 1934
<i>C. limon</i> (L.) Burm., limão eureka	9	—	Longley (15) 1925
Limão Gênova	9	—	Nakamura (20) 1934
Limão siciliano	9	—	Nakamura (20) 1934
Diversas outras variedades de limão ...	9	—	Nakamura (20) 1934
Limão rugoso (vide <i>C. verucosa</i>)	—	18	Bacchi (1) 1940
Limão doce	—	18	Bacchi (1) 1940
Limão Lisboa	—	18	Krug 1943
Limone interdonato	9	—	Ruggieri (24) 1935
Limão Lisboa	9	—	Frost (6) 1926

(*) Este pomelo é uma variedade poliembrônica sem interesse comercial, apresentando caracteres tanto de *Citrus grandis* como de *C. paradisi*. (Vide adenda de Frost).

(Continuação)

MATERIAL	N.º DE CRO- MOSÔMIOS		AUTOR E ANO
	Gamé- ticos	Somá- ticos	
(4n) Limão Lisboa tetraplóide	18	—	Frost (4) 1925
Seedlings do Limão Ponderosa (vide <i>C. piriformis</i>)	—	18	Lapin (14) 1937
(4n, 6n) Seedlings do Limão Ponderosa	—	36	Lapin (14) 1937
.....	—	54	Lapin (14) 1937
(3n) Quatro seedlings de polinização aberta (*)	—	27	Lapin (14) 1937
Limão eureca variegada (côr-de-rosa)(**)	9	—	Frost (não publicado, 1942)
* <i>C. limonia</i> Osbeck, Lima Kusaie	9	—	Nakamura (20) 1934
Lima Rangpur	9	—	Nakamura (20) 1934
Japansche citroen	9	—	Toxopeus (31) 1933
var. <i>otahitensis</i> Tanaka, Otaheite orange	9	—	Nakamura (20) 1934
var. <i>khatta</i> Tanaka, Khatta orange	9	—	Nakamura (20) 1934
<i>C. macroptera</i> Montr.	9	—	Krug 1943
<i>C. medica</i> L., cidra	8	—	Strassburger (25) 1907
.....	9	—	Longley (15) 1925
var. <i>sarcodactylis</i> Swingle	9	—	Nakamura (20) 1934
Cidra	—	18	Bacchi (1) 1940
Cidra filipina	—	18	Krug 1943
Cidra italiana	—	18	Krug 1943
Cidra indiana	—	18	Krug 1943
Limão chinês (***)	9	—	Frost (não publicado, 1942)
* <i>C. medioglobosa</i> Tan	9	—	Nakamura (20) 1934
* <i>C. microcarpa</i> Bunge, Calamondim (duas variedades)	9	—	Nakamura (20) 1934
Calamondim tetraplóide	18	—	Nakamura (19) 1934
* <i>C. mitis</i> Blanco, Calamondim	9	—	Longley (15) 1925
.....	—	18	Bacchi (1) 1940
* <i>C. natsudaoidai</i> Hayata	9	—	Nakamura (20) 1934
* <i>C. nobilis</i> Lour. Mandarinina ou laranja King	9	—	Frost (não publicado, 1927)
Mandarina King	9	—	Nakamura (20) 1934
(4n) Mandarinina King tetraplóide	18	—	Frost (6) 1926
Kunembo	9	—	Nakamura (20) 1934
* <i>C. obovata</i> Rafin	9	—	Nakamura (20) 1934
* <i>C. oleocarpa</i> Hort. ex Tanaka	9	—	Nakamura (20) 1934
* <i>C. paradisi</i> Macf. Pomelo Duncan	9	—	Longley (15) 1925
Pomelo Marsh	9	—	Longley (15) 1925
Pomelo Marsh (Linhagem com semen- tes) (****)	9	—	Frost (não publicado, 1926)

(*) Lapin (14) também obteve cinco "seedlings" triplóides de sementes, procedentes da polinização não controlada, da "Shivamikan" (espécie ?).

(**) De origem desconhecida, aparentemente idêntica a uma linhagem derivada, por variação de borbulha, do limão eureca, apenas diferindo desta pela côr dos frutos.

(***) Trata-se de uma variedade (C.E.S. 710) que se parece muito com uma cidra, apesar de os frutos serem mais do tipo de limão.

(****) A origem deste tipo, pela mutação somática, não está confirmada.

(Continuação)

MATERIAL	N.º DE CRO- MOSÔMIOS		AUTOR E ANO
	Gamé- ticos	Somá- ticos	
(4n) Pomelo Marsh (Linhagem com se- mentes) tetraplóide	18	—	Frost (6) 1926
Pomelo Imperial	9	—	Frost (3) 1925
(4n) Pomelo Imperial tetraplóide	18	—	Frost (7) 1927
(4n) Pomelo Hall tetraplóide	18	—	Frost (não publicado, 1938)
(4n) Pomelo McCarty tetraplóide	—	36	Bacchi (não publicado)
(3n) "Seedling" (obtido pela polinização aberta)	—	27	Lapin (14) 1937
* <i>C. pectinifera</i> (= * <i>C. leiocarpa</i> Hort.?)	—	18	Yarnell (33 d) 1940
* <i>C. piriformis</i> Hassk., Limão Ponderosa (um híbrido?)	9	—	Nakamura (20) 1934
* <i>C. poonensis</i> Hort. ex Tanaka, Ponkan.	9	—	Nakamura (20) 1934
* <i>C. reticulata</i> Blanco, Tangerina Dancy	9	—	Longley (15) 1925
(4n) Tangerina Dancy tetraplóide	18	—	Frost (7) 1927
Mandarina Willow Leaf	9	—	Longley (15) 1925
(4n) Mandarina Willow Leaf tetraplóide ..	18	—	Frost (7) 1927
Unshu (=satsuma)	8	—	Osawa (22) 1912
Laranja Satsuma	9	—	Longley (15) 1925
Owari satsuma	9	—	Nakamura (18) 1929
Wase satsuma	9	—	Nakamura (18) 1929
Owari (?) satsuma	9	—	Frost (não publicado, 1927)
(4n) Owari (?) satsuma tetraplóide	18	—	Frost (7) 1927
(4n) Satsuma tetraplóide	—	36	Lapin (14) 1937
<i>C. sinensis</i> Osbeck, laranja doce	8	—	Strassburger (25) 1907
Laranja abacaxi	9	—	Longley (15) 1925
Laranja valência	9	—	Longley (15) 1925
Laranja Maltese Oval (*)	9	—	Frost (3) 1925
Laranja "Paper Rind" (St. Michael)	9	—	Frost (3) 1925
(4n) Laranja "Paper Rind" tetraplóide ..	18	—	Frost (4) 1925
Djeroek manis	9	—	Toxopeus (31) 1933
Kinkunembo	9	—	Nakamura (20) 1934
Laranja Lue Gim Gong	9	—	Nakamura (20) 1934
Laranja "Maltese Blood"	9	—	Nakamura (20) 1934
Laranja "Parson Brown"	9	—	Nakamura (20) 1934
Laranja "Navelencia"	9	—	Nakamura (20) 1934
Laranja "Washington Navel"	9	—	Nakamura (20) 1934
Seis outras variedades de laranjas	9	—	Nakamura (20) 1934
(3n) Dois "seedlings" obtidos pela polini- zação aberta	—	27	Lapin (14) 1937
Laranja doce	—	18	Bacchi (1) 1940
Laranja Bahia	—	18	Bacchi (1) 1940
Laranja imperial	—	18	Bacchi (1) 1940 ..
Laranja "Ruby"	9	—	Frost (não publicado, 1927)
(4n) Laranja "Ruby" tetraplóide	18	—	Frost (7) 1927
(4n) Laranja tetraplóide	—	36	Lapin (14) 1937
Laranja Shamouti (Jaffa)	9	—	Oppenheim e Frankel (21) 1929

(*) De acordo com Hume, esta variedade era antigamente cultivada na Califórnia com o nome de "Mediterranean Sweet"; pé compacto, semi-anão.

(Continuação)

MATERIAL	N.º DE CROMOSÔMIOS		AUTOR E ANO
	Gaméticos	Somáticos	
* <i>C. succosa</i> Hort. ex Tanaka	9	—	Nakamura (20) 1934
* <i>C. sunki</i> Hort. ex Tanaka	9	—	Nakamura (20) 1934
* <i>C. surcata</i> Hort. ex Tanaka (?)	9	—	Nakamura (20) 1934
<i>C. tachibana</i> (Nak.) Tan.	9	—	Nakamura (20) 1934
* <i>C. tamurana</i> Tan.	9	—	Nakamura (20) 1934
* <i>C. tangerina</i> Hort. ex Tanaka (2 varied.es)	9	—	Nakamura (20) 1934
* <i>C. tankan</i> Hayata.	9	—	Nakamura (20) 1934
* <i>C. verrucosa</i> Hort. ex Tanaka (?) Limão rugoso	9	—	Nakamura (20) 1934
* <i>C. Webberi</i> Wester	—	18	Yarnell (33 d) 1940 e Krug 1943
* <i>C. yatsushiro</i> Hort. ex Tanaka	9	—	Nakamura (20) 1934
Subtribu 3: Balsamocitrinae			
<i>Afrægle gabonensis</i> (Swingle) Engler	—	18	Krug 1943
<i>Aeglopsis chevalieri</i> Swingle	9	—	Longley (15) 1925
<i>Feronia limonia</i> (L.) Swing.	9	—	Toxopeus (31) 1933
HÍBRIDOS			
1. Tangelo "Sampson" (<i>C. paradisi</i> x <i>C. reticulata</i>)	9	—	Longley (15) 1925
2. Progenie do Tangelo "Sampson"	—	36	Yarnell (33 c) 1939
3. Progenie do Tangelo "Thornton"	—	27	Yarnell (33 c) 1939
4. Limaquat "Eustis" (<i>C. aurantifolia</i> x <i>Fortunella japonica</i>)	9	—	Longley (15) 1925
5. Citrangequat "Thomasville" (<i>Fortunella margarita</i> x Citrange "Willits" = <i>Poncirus trifoliata</i> x <i>C. sinensis</i>) ..	9	—	Nakamura (20) 1934
6. Sacaton citraldin (C.E.S. 2619)	—	18	Krug 1943
7. (<i>Citrus aurantifolia</i> x <i>Fortunella japonica</i>) (*) x <i>Fortunella Hindsii</i> (dois híbridos)	27 2	—	Longley (16) 1926; Traube Robinson (32), 1937
8. Cerca de 20 híbridos diferentes de <i>Citrus</i> , derivados de 4 variedades (♀) pertencentes a três espécies	27 2 (aproximadamente)	—	Frost (7, 8) e não publicado, 1927, 1930
9. <i>Citrus limon</i> x <i>C. grandis</i>	—	27	Lapin (14) 1937
10. <i>Citrus limon</i> x <i>C. paradisi</i> (Quatro híbridos)	—	27	Lapin (14) 1937
11. Limão "Novofon" x Limão "Meyer" ..	—	28	Luss (17) 1935
12. <i>Citrus limon</i> x Limão "Meyer" (idêntico ao anterior ?)	—	28	Lapin (14) 1937
13. Quinze outros híbridos derivados de 3 espécies (♀)	—	27	Lapin (14) 1937
14. <i>Citrus sinensis</i> (baianinha) x <i>C. sinensis</i> (sabará)	—	45	Bacchi (não publicado)
15. Mandarina "Clementine"	9	—	Lacarelle e Miedzyrzecki (12) 1937

(*) Longley (16) mencionou a *F. margarita* como sendo o "kumquat" utilizado para obtenção deste "limequat", mas Swingle (28) afirma que o "limequat" cruzado com o *F. Hindsii* foi o "Eustis", que possui a ascendência mencionada no quadro. (Vide também: Swingle, W. T. e T. R. Robinson em Jour. Agric. Res. 23 : 229-238 1923).

No quadro I adotou-se a seqüência geral da nova classificação proposta por Swingle (26), apesar de que muitos nomes específicos não são aceitos por este autor (informação verbal); por exemplo, muitas espécies de Tanaka não reconhecidas como espécies distintas por Swingle, foram incluídas tal como se acham mencionadas nas publicações de Nakamura (18-20). Em alguns casos também foram mencionados nomes de variedades hortícolas, uma vez que também estas são de importância para os investigadores do gênero *Citrus*. Com o fim de apresentar uma lista, o mais completa possível, incluíram-se também as novas determinações feitas pelo autor deste trabalho. Neste quadro, as formas tetraplóides, que representam descendências de "seedlings" nucelares de determinadas variedades hortícolas, foram mencionadas com os nomes destas variedades, adicionando-se-lhes a palavra "tetraplóide" (sugestão de H. B. Frost).

Dos trinta e três gêneros de que se compõe esta sub-família, a constituição cromossômica de apenas 15 é até hoje conhecida; todos estes possuem 9 como seu número básico. Com relação à ocorrência de formas poliplóides, preparou-se o seguinte sumário:

Triplóides. Mais de 50 triplóides ou "quase" triplóides foram encontrados no gênero *Citrus*. Vários triplóides são híbridos entre um híbrido diplóide *Citrus-Fortunella* e um *Fortunella* tetraplóide (13, 25). Cerca de 40 são híbridos entre variedades diplóides de *Citrus*, julgando-se que se tenham originado pela duplicação dos cromossômios, principalmente no nucelo, antes da formação do arquespório, ou, ainda, pela falta de redução dos megasporocitos (5). 13 constituem "seedlings" obtidos pela polinização não controlada (Lapin e Yarnell). Apenas 2, as limas "Tahiti" e "Bearss" (*C. aurantifolia* Swingle), são de interesse econômico e foram recentemente identificadas como sendo triplóides. Triplóides foram produzidos por um total de 5 espécies de *Citrus* (caso se classifique o *C. paradisi* como espécie).

Tetraplóides. Estes têm sido encontrados, até a presente data, em quatro gêneros (*Triphasia*, *Fortunella*, *Poncirus* e *Citrus*) e em um híbrido interespecífico; eles têm aparecido com maior freqüência em *Citrus* (no mínimo em 4 espécies (5 incluindo *C. paradisi*), de acordo com a classificação de Swingle, e em numerosas variedades hortícolas), provavelmente pelo fato de este gênero ser maior e por ter sido investigado mais detalhadamente do que qualquer outro.

Poliplóides mais elevados. Além da tetraploidia, aparentemente, apenas duas outras formas foram até hoje encontradas: uma

laranja híbrida pentaplóide (Bacchi, não publicado) e um limão hexaplóide, este último obtido pela polinização não controlada do limão "Ponderosa" (14).

Aneuplóides. Apenas recentemente foram encontrados vários casos de aneuploidia; dois (um ?) híbridos foram mencionados (14, 17) com 28 cromossômios somáticos, tendo servido como agente polinizador o limão "Meyer" diplóide.

Bacchi (1) encontrou 28 cromossômios numa outra forma de *Citrus*, que foi omitida do quadro I, porquanto não há certeza ainda quanto à sua classificação específica e de variedade. Na progênie desta forma, obtida de sementes procedentes de flores não controladas, obtiveram-se 8 "seedlings" (Bacchi, não publicado) com, respectivamente, 21, 21, 23, 29, 30, 33, 37 e 37 cromossômios. Apesar de possuírem um número anormal de cromossômios, algumas destas plantas aparentam um desenvolvimento normal. Na progênie da lima triplóide "Tahiti" também foram encontrados 3 aneuplóides (1), com 19, 20, e 21 cromossômios, respectivamente.

O melhorador do gênero *Citrus* já tem, pois, à sua disposição, informações citológicas de valor, como os números de cromossômios atrás citados, não só de muitas das suas espécies como também de vários gêneros próximos. O fato de que o número básico de cromossômios é o mesmo, para todos os representantes deste grupo até agora analisados, tornou possível a realização de cruzamentos entre gêneros muito afastados, como, por exemplo, entre *Citrus*, *Fortunella* e *Poncirus*; a semelhança dos complementos cromossômicos destes três gêneros é deveras surpreendente, porquanto um pareamento normal dos cromossômios em meiose tem sido observado num destes cruzamentos trigenéricos (20). Este fato constitui um problema para o taxonomista, indicando que estes três gêneros talvez possam ser considerados como simples espécies de um só gênero. Nada se conhece até agora sobre o desenvolvimento evolucionário nesta sub-família. Baseado na semelhança dos genómeos de *Fortunella*, *Citrus* e *Poncirus*, Nakamura (20) sugere que a evolução das espécies dentro dos gêneros talvez se tenha processado pela formação de novos alelos. Futuras investigações citológicas, completadas por análises genéticas, cuja execução é bastante dificultada pelo fenômeno da poliembrião, sem dúvida conduzirão à elucidação das relações citogenéticas entre os representantes deste importante grupo de plantas.

SUMÁRIO

1. O número de cromossomos de 14 espécies (20 formas), pertencentes a cinco gêneros diferentes da sub-família *Aurantioideæ*, foi aqui apresentado. Tôdas as determinações do número de cromossomos, até hoje feitas nesta sub-família, e encontradas na literatura, foram incluídas num quadro geral. O número básico é de $x=9$ para tôdas as formas até agora investigadas. Inclue o quadro acima referido: cêrca de 50 triplóides, cêrca de 190 tetraplóides (inclusive 19 de *Poncirus*, 1 de *Triphasia* e 1 forma selvagem de *Fortunella*, (*) um pentaplóide, 1 hexaplóide e 14 ou 15 aneuplóides (**).

2. Todos êstes poliplóides, com exceção dos 21 tetraplóides atrás mencionados, e vários híbridos triplóides entre *Citrus* e *Fortunella*, pertencem ao gênero *Citrus*. Considerando-se a semelhança genética dos complementos cromossômicos de vários dos gêneros da subtribu *Citrinæ*, chega-se à conclusão de que alguns dêles talvez devam ser considerados como meras espécies de um só gênero.

AGRADECIMENTOS

O autor deseja aquí registrar os seus agradecimentos à John Simon Guggenheim Memorial Foundation, que lhe proporcionou, em 1941, uma estada de vários meses na Citrus Experiment Station, Riverside, da Universidade da Califórnia, e ao Diretor e funcionários técnicos da Divisão de Plant Breeding e Orchard Management desta Estação Experimental, por tôdas as facilidades que lhe foram proporcionadas. Ao dr. H. B. Frost são devidos agradecimentos especiais pela revisão geral do texto, efetuado quando o autor já se achava no Brasil, de volta. Esta revisão, motivando a adenda que se segue, se baseou, em parte, no trabalho de W. T. Swingle (28), naquela ocasião ainda não publicado, e cujo original não pôde ser consultado pelo autor.

SUMMARY

1. The chromosome number of fourteen species (twenty forms) belonging to five different genera of the subfamily *Aurantioideæ* are reported. All determinations available in the literature on chromosome numbers made in this subfamily are tabulated. The basic chromosome number is $x=9$ for all forms so far investigated. About 40 triploids,

(*) Os triplóides são, todos, sem dúvida, "seedlings" gaméticos e, portanto, todos distintos sob o ponto de vista genético, apesar de que alguns dêles apresentam a mesma ascendência. Os tetraplóides presumivelmente têm todos como origem "seedlings" nucelares (origem apomítica), com exceção de um caso de variação somática tetraplóide (9). O número de formas tetraplóides distintas (derivadas de formas diplóides diferentes) provavelmente é bem superior a 20.

(**) Êste número inclue um trisômico "de fragmento" ($2n=18+1$ fragmento), mencionado por Brown (2); trata-se de um citrange (*Poncirus trifoliata* x *Citrus sinensis*), não se conhecendo o nome, da variedade.

some 190 tetraploids (including 19 in *Poncirus*, 1 in *Triphasia*, and 1 wild form in *Fortunella*), 1 pentaploid, 1 hexaploid, and 14 or 15 aneuploids have been reported.

2. All these polyploids, except the 21 tetraploids just mentioned and several triploid hybrids between *Citrus* and *Fortunella*, belong to the genus *Citrus*. Considering the genetic similarity of the chromosome complements of several genera of the subtribe *Citrinae*, it is suggested that some of these might perhaps better be considered mere species of a single genus.

LITERATURA CITADA

1. **Bacchi, O.** Observações citológicas em *Citrus*. I. Número de cromossomos de algumas espécies e variedades. *Jornal de Agronomia, Piracicaba* **3** : 249-258. 1940.
2. **Brown, W. L.** A modified root-tipe smear technic. *Stain Technol.* **12** : 137-138. 1937.
3. **Frost, H. B.** The chromosomes of *Citrus*. *Jour. Wash. Acad. Sci.* **15** : 1-3. 1925.
4. **Frost, H. B.** Tetraploidy in *Citrus*. *Proc. Nat. Acad. Sci.* **11** : 535-537. 1925.
5. **Frost, H. B.** Polyembryony, heterozygosis and chimeras in *Citrus*. *Hilgardia* **1** : 365-402. 1926.
- 6, 7, 8. **Frost, H. B.** California Agr. Exp. Sta. Ann. Rept. : Plant Breeding. 1926, 1927, 1930.
9. **Frost, H. B. e C. A. Krug.** Diploid-tetraploid periclinal chimeras as bud variants in *Citrus*. *Genetics* **27** : 619-634. 1942.
10. **Kandelaki, G. V.** Karyological investigations of some cultivated species and varieties of the genus *Citrus*. *Trav. Inst. Bot. Tbilissi* **4** : 109-120. 1938. (*Cit. Plant Breed. Abstr.* **9** : 465. 1939).
11. **Krug, C. A. e O. Bacchi.** Cytological observations in *Citrus*. II. Triploid varieties of *Citrus*. *Jour. Heredity* **34** : 277-283. 1943.
12. **Lacarelle, A. e Ch. Miedzyrzecki.** Nouvelle contribution à l'étude du Clementinier au Maroc. *Experimentation Fruitière et Maraîchère*, Rabat, Morocco. Edition Terre Marocaine. 1937.
13. **Lapin, W. K.** Concerning the genotypic homogeneous stock for the *Citrus* trees. *Terre Marocaine*, **2** : 24-27. 1937. (*Cit. Plant Breed. Abstr.* **8** : 73. 1938).
14. **Lapin, W. K.** Investigations on polyploidy in *Citrus*. U.S.S.R. All-Union Sci. Res. Institute. Humid Subtropics Works **1** : 1-68. 1937. (*Cit. Plant Breed. Abstr.* **9** : 339. 1939).
15. **Longley, A. E.** Polycary, polyspory and polyploidy in *Citrus* and *Citrus* relatives. *Jour. Wash. Acad. Sci.* **15** : 347-351. 1925.
16. **Longley, A. E.** Triploid *Citrus*. *Jour. Wash. Acad. Sci.* **16** : 543-545. 1926.
17. **Luss, A. I.** Citrus introduction and selection in the U.S.S.R. *Soviet Subtropics* **11** : 17-27. 1935. (*Cit. Plant Breed. Abstr.* **6** : 1372. 1936).
18. **Nakamura, Miyawo.** Cytological studies in the genus *Citrus*. I. On the Wase satsuma originated through bud variation. *Studia Citologica* **3** : 1-14. 1929.
19. **Nakamura, Miyawo.** A preliminary report on the chromosome number, pollen sterility and the formation of abnormal pollen tetrads in *Citrus*. *Bull. Kagoshima Coll. Agr. For.* **1** : 11-14. 1934. (*Cit. Plant Breed. Abstr.* **7** : 234. 1937).
20. **Nakamura, Miyawo.** Cytological studies in the genus *Citrus*. II. The chromosome number, pollen sterility and the formation of abnormal tetrads. *Studia Citologica* **6** : 162-178. 1934. (*Cit. Plant Breed. Abstr.* **8** : 489. 1938).
21. **Oppenheim, J. D. e Frankel, O. H.** Investigations into the fertilization of the Jaffa orange. *Genetica* **11** : 369-374. 1929.
22. **Osawa, J.** Cytological and experimental studies in *Citrus*. *Jour. Coll. Agr. Imp. Univ. Tokyo* **4** : 83-116. 1912.

23. **Randolph, L. F.** A new fixing fluid and a revised schedule for the paraffin method in plant cytology. *Stain Technol.* **10** : 95-96. 1935.
24. **Ruggieri, Gaetano.** Sopra i presunti rapporti genetici col limone o col cedro di una particolare varietà di limone assai resistente alla *Deuterophoma tracheiphila* Petri. *R. Staz. Patolog. Veg. Roma Bol. n. s.* **15** : 496-499. 1935.
25. **Strassburger, Eduard.** Ueber die Individualitaet der Chromosomen und die Prophybriden-Frage. *Jahrb. wiss. Bot.* **44** : 482-555. 1907.
26. **Swingle, W. T.** A new taxonomic arrangement of the orange subfamily, Aurantioideae. *Jour. Wash. Acad. Sci.* **28** : 530-533. 1938.
27. **Swingle, W. T.** "Kindzu" or "Golden Bean" orange (*Fortunella Hindsii*) from historic, taxonomic, and cytologic standpoints. *Proc. 3d Pan-Pacific Sci. Cong. (Tokyo)* **2** : 2001. 1929.
28. **Swingle, W. T.** The botany of *Citrus* and its wild relatives. In Webber, H. J., et al., *The Citrus Industry*. Univ. Calif. Press, Berkeley, In press.
29. **Tanaka, T.** Taxonomie de la citriculture tropicale. *Rev. Bot. Appl.* **10** : 1914-11. 1930.
30. **Tanaka, Tyôzaburô.** Taxonomy of the *Citrus* fruits of the Pacific region. *Tanaka Citrus Exp. Sta. Mem.* **1** : 15-36. 1927.
31. **Toxopeus, H. J.** Some cases of bud variation in *Citrus* observed on Java. *Genetica* **15** : 241-252. 1933.
32. **Traub, H. P. e T. R. Robinson.** Improvement of subtropical fruit crops : *Citrus*. U. S. Dept. Agr. Yearbook **1937** : 749-826. 1937.
33. **Yarnell, S. H.** Cytological investigations (in *Citrus*). *Texas Agricult. Exp. Sta.*
 - a. 50th Annual Report pg. 31, 1937
 - b. 51st " " pg. 23, 1938
 - c. 52nd " " pg. 23, 1939
 - d. 53rd " " pg. 22, 1940

ADENDA POR HOWARD B. FROST

(Fev. 1943)

Tôdas as formas de *Citrus*, investigadas sob o ponto de vista citológico, e que foram convenientemente identificadas, em publicações, pelos seus nomes vernaculares de variedades, foram agrupadas pelo autor dêste trabalho pelas respectivas espécies, reconhecidas por Swingle (28). Entretanto, torna-se evidentemente impossível classificar, desta maneira, tôdas as determinações cromosômicas publicadas sob nomes específicos inválidos; em parte, devido à imperfeição das respectivas identificações e, além disso, pelo fato de algumas formas constituírem, evidentemente, híbridos interespecíficos ou mesmo intergenéricos.

A pedido do autor, efetuou-se, na Citrus Experiment Station, Riverside, Califórnia, uma revisão da publicação atrás. Tal revisão se baseou na monografia de Swingle (28) sôbre as *Aurantioideæ*, cujas provas foram postas à nossa disposição. Acrescentamos também algumas poucas formas de *Citrus*, em maioria procedentes das nossas próprias investigações ainda não publicadas.

Os nomes marcados como inválidos pertencem a grupos e variedades hortícolas, que, em alguns casos, talvez representem híbridos entre espécies de *Citrus* ou contenham, mesmo, outros gêneros, não devendo, por êsse motivo, ser classificados como espécies distintas. Alguns casos merecem uma explicação especial: *C. nobilis* Lour. se baseou no "King mandarin" ou numa forma muito semelhante (28); Swingle, entretanto, considera o "King" um híbrido interespecífico, talvez entre *C. reticulata* e *C. sinensis*, e, por êsse motivo, a espécie que integra as tangerinas vem a ser o *C. reticulata* Blanco (o nome válido mais antigo). Na monografia de Swingle (provas) o "grapefruit" (pomelo) é classificado como constituindo uma "espécie satélite", *C. paradisi*, que é intimamente relacionada com as toranjas ("shaddocks"); assim sendo, as variedades de "grapefruit" são, portanto, apresentadas à parte. As limas "Rangpur" e "Kusaie" representam, provavelmente, tangerinas ("mandarins") ácidas, *C. reticulata* var. *austera*, ou também, possivelmente, híbridos entre *C. reticulata* e *C. aurantifolia*. O limão "Meyer", a laranja "Otaheite", a "Japansche citroen" (31), o "Juzu" (*C. junos*) e *C. webberi* parecem, todos, constituir híbridos interespecíficos. O Calamondim (*C. mitis* ou *C. microcarpa*) é considerado como sendo um híbrido intergenérico (*Citrus* x *Fortunella*). As classificações e descrições de Tanaka (30) demonstram que as seguintes "espécies" apenas constituem **formas** de *C. reticulata*: *deliciosa*, *depressa*, *erythroa*, *genshokan*, *glaberrima*, *kinokuni*, *poonensis*, *succosa* e *tangerina*; também não parece haver dúvida que *tankan* e *natsudaiddai* são intimamente relacionadas com *sinensis*.

Em aditamento aos dados apresentados no quadro I, Nakamura (20) encontrou 9 cromossômios como sendo o número gamético em 9 formas de *Citrus*, que êle não agrupou por espécies. Lapin (14) publicou a respeito de "seedlings" tetraplóides, não incluídos no quadro atrás referido, derivados das seguintes espécies: *C. grandis*, *C. limon*, *C. natsudaiddai* e *C. paradisi*; todos os pés que forneceram, em sua descendência, tais tetraplóides, produziam, normalmente, "seedlings" diplóides. Nas culturas de Lapin, bem como nas de Frost, uma parte dêstes tetraplóides se originou em forma de "seedlings" nucelares (apomíticos), que acompanhavam, nas mesmas sementes, "seedlings" híbridos interespecíficos; provavelmente, todos os demais tetraplóides também tiveram origem nucelar, pois nenhum dêles era híbrido.

OBSERVAÇÕES CITOLÓGICAS EM CITRUS

V. Poliploidia em relação à densidade e ao tamanho dos estomas em *Citrus* e outros gêneros das *Aurantioideae*.

C. A. Krug

O. Bacchi

INTRODUÇÃO

O estudo da influência do número de cromossômios sobre a densidade e o tamanho dos estomas nas folhas já tem sido realizado em numerosas plantas; de um modo geral, verificou-se que um aumento do número de cromossômios resulta num aumento do tamanho dos estomas e numa diminuição do seu número por unidade de área. Isto se explica pelo fato de as células, contendo núcleos poliplóides, serem, regra geral, de tamanho também maior do que as que possuem núcleos diplóides.

A natureza dos estomas em *Citrus* e outros gêneros da sub-família das *Aurantioideae* já tem sido objeto de estudos por parte de vários investigadores. Assim, Reed e Hirano (12) se preocuparam, de preferência, com a densidade dos estomas nas folhas de *Citrus sinensis* e *C. limon*, chegando às seguintes conclusões: que estes só são encontrados na face inferior das folhas; que existem grandes variações no seu tamanho na mesma folha; constataram a presença de áreas desprovidas de estomas em torno dos pêlos epidermais, das glândulas de óleo e de estomas muito grandes e, ainda, um arranjo radial dos estomas em torno daquelas glândulas e variações na sua densidade nas diversas regiões da folha, existindo poucos em sua base, um número máximo no centro e intermediário na ponta. Acharam, mais, que o aumento do tamanho das folhas e o sombreamento diminuem a densidade dos seus estomas. Hirano (5) examinou um grande número de representantes da sub-família das *Aurantioideae*, procurando correlacionar o grau de densidade dos estomas com as condições ecológicas existentes nas regiões de origem ou nas zonas de mais fácil adaptação de cada um destes representantes. De modo geral concluiu que as espécies de *Citrus* com 500 ou mais estomas por mm² vegetam de preferência nos trópicos, portanto em clima úmido

e quente, e que aquelas com menos de 500 estomas por mm^2 são encontradas mais freqüentemente em regiões localizadas entre 23,5 e 44° latitude N e S do Equador, existindo, entretanto, várias exceções a esta regra. Verificou, mais, que é grande a variabilidade do número médio de estomas, por unidade de área, dentro de cada espécie, afastando-se os extremos de cada grupo de menos de 100 por mm^2 para *C. aurantium*, *C. junos* e *C. paradisi*; de 100 a 200 por mm^2 para *C. hystrix*, *C. limon*, *C. maxima* e *C. sinensis* e mais de 200 por mm^2 para *C. aurantifolia*, *C. medica* e *C. reticulata*. Entre os gêneros, as diferenças verificadas foram ainda muito maiores, tendo sido as médias mínimas e máximas encontradas, respectivamente, de $167 \pm 1,7$ por mm^2 para *Eremocitrus glauca* e $1.064 \pm 3,7$ para *Severinia buxifolia*.

Turrell e Klotz (14) estudaram os estomas na casca dos frutos da Washington Navel (*C. sinensis*), concluindo que a sua densidade é maior nos frutos pequenos e que em torno das glândulas de óleo o seu arranjo é também radial como observado por Reed e Hirano (12) nas fôlhas.

O presente trabalho foi iniciado pelo primeiro dos autores na Citrus Experiment Station, Riverside, Califórnia (USA) (*) e completado pelo outro autor na Secção de Citologia do Instituto Agrônômico do Estado de São Paulo, em Campinas. Teve por finalidade: 1) tentar explicar, pela possível existência de tipos poliplóides, a razão da grande variabilidade do número de estomas encontrada, por unidade de área, por Hirano (5), e 2) tentar delinear um método simples de identificar mudas tri e tetraplóides em viveiros de *Citrus* pela determinação do tamanho dos seus estomas.

NÚMERO DE CROMOSÔMIOS E DENSIDADE DOS ESTOMAS

Com o intuito de verificar se a grande variabilidade na densidade dos estomas encontrada por Hirano (5), em numerosos representantes do gênero *Citrus* e outros gêneros próximos da mesma sub-família, talvez pudesse ser explicada, ao menos em certos casos, pela existência, neste material, de formas poliplóides, procedeu-se à realização de pesquisas bibliográficas, com o fim de conhecer a constituição citológica do material utilizado, e, também, à contagem do número de cromosômios em 18 dos indivíduos examinados por aquele autor, todos existentes na coleção da Citrus Experiment Station de Riverside, Califórnia. As determinações do número de cromosômios, feitas por outros investigadores, em localidades

(*) Guggenheim Fellow 1940-41.

diferentes, naturalmente só podem ser interpretadas com certas reservas em relação à densidade dos estomas nas respectivas espécies, feitas exclusivamente em Riverside. As novas contagens foram efetuadas pelo primeiro dos autores, em meristemas de raízes obtidas de estacas na Estação Experimental acima referida.

No quadro I apresentamos o material estudado por Hirano (5) e os seus respectivos números de cromossômios:

QUADRO I

DENSIDADE DOS ESTOMAS (1) E NÚMERO DE CROMOSSÔMIOS

C.E.S. n.º (2)	GÊNERO, ESPÉCIE OU VARIEDADE	N.º de estomas por mm ²	N.º DE CRO- MOSÔMIOS		AUTOR
			n	2n	
	<i>Citrus aurantifolia</i>				
564	Bearss Seedless Lime ..	326 ± 2,4	—	27	Krug 1943
391	Tahiti Lime	375 ± 3,2	—	27	Krug 1943 (3)
452	Kusai Lime	595 ± 2,8	—	18	Krug 1943
1710	Mexican Lime	514 ± 2,6	—	18	Krug 1943
1665-B	<i>C. junos</i>	429 ± 2,3	9	—	Nakamura 1934
432	<i>C. hystrix</i> (4)	550 ± 2,4	9	—	Krug 1943
2454	(fôlhas e frutos grandes)				
	<i>C. hystrix</i>	704 ± 3,5	—	18	Krug 1943
	(fôlhas pequenas, frutos pequenos, enrugados)				
	<i>C. limonia</i>				
400	Rough lemon (5)	552 ± 2,8	—	18	Krug 1943
1482	Sweet lemon (5)	635 ± 2,5	—	18	Krug 1943
	Eureka lemon (5)	636 ± 2,5	9	—	Longley 1925
584	Lisbon lemon (5)	743 ± 3,6	—	18	Krug 1943
	<i>C. nobilis</i>				
1852	Kunembo	377 ± 4,8	—	9	Nakamura 1934
277	Dancy (6)	415 ± 1,8	9	18	Longley 1925
					Bacchi (não pu- blicado, 1943)
					(7)
—	Unshiu (Satsuma) (6) ..	445 ± 2,8	8	—	Osawa, 1912
594	King	463 ± 2,7	9	—	Frost (não publi- cado, 1927) e
					Nakamura, 1934
270	Cleopatra (6)	552 ± 3,7	—	18	Bacchi (não publi- cado, 1943) (7)
696	Kinokuni	582 ± 2,6	9	18	Nakamura 1934,
					Bacchi (não pu- blicado, 1943)
					(7)

(Continuação)

C.E.S. n.º (2)	GÊNERO, ESPÉCIE OU VARIEDADE	N.º de estomas por mm ²	N.º DE CRO- MOSÔMIOS		AUTOR
			n	2n	
	<i>C. medica</i>				
138-B	Indian Citron	552 ± 2,2	—	18	Krug 1943
757	Phillipine Citron	623 ± 3,3	—	18	Krug 1943
601	Chinese lemon	643 ± 3,3	—	18	Krug (não publi- cado, 1941)
128	Italian Citron	873 ± 4,7	—	18	Krug 1943
1458	<i>C. mitis</i>	665 ± 7,7	9	18	Longley 1925 Bacchi 1940
—	Marsh	583 ± 3,2	9	—	Longley 1925
	<i>C. sinensis</i>				
255	Lue Gim Gong Orange	402 ± 2,5	9	—	Nakamura 1934
—	Washington Navel Oran- ge	458 ± 2,7	9	—	Nakamura 1934
282	Jaffa Orange	473 ± 1,8	9	—	Oppenheim and Frankel 1929
—	Valencia Orange	504 ± 2,7	9	—	Longley 1925
591	St. Michael Orange (pa- per rind)	531 ± 2,7	9	—	Frost 1925
299	Ruby Blood Orange....	533 ± 2,5	9	—	Frost (não publi- cado, 1927)
1455	<i>C. Webberi</i>	769 ± 6,0	—	18	Krug 1943
1484	<i>Microcitrus australasica</i> ..	407 ± 2,5	—	18	Krug 1943
268	<i>Fortunella margarita</i>	461 ± 3,3	9	—	Longley 1925
1484	<i>Microcitrus australasica</i> , var. <i>sanguinea</i>	485 ± 2,2	—	18	Krug 1943
—	<i>Poncirus trifoliata</i>	495 ± 3,8	9	—	Longley 1925
1432	<i>Balsamocitrus</i> (8) <i>gabonensis</i>	553 ± 2,3	—	18	Krug 1943
1450	<i>Citropsis Schweinfurthi</i> ...	589 ± 3,5	9	—	Longley 1925
1430	<i>Atalantia citroides</i>	697 ± 2,5	—	18	Krug 1943
1492	<i>Severinia buxifolia</i>	1064 ± 3,7	9	—	Longley 1925

- (1) Extrato parcial das Tabelas III e IV de Hirano (5).
- (2) N.º da Citrus Experiment Station.
- (3) Confirmando determinação anterior, feita por Bacchi (1).
- (4) Mais tarde identificada por W. T. Swingle como sendo *C. macroptera* Montr.
- (5) Variedades classificadas por Swingle (13) em *C. limon* (1) Burm.
- (6) Classificados por W. T. Swingle (13) em *C. reticulata* Blanco.
- (7) Contagens feitas em material trazido por C. A. Krug e colhido nas árvores da Citrus Experiment Station, utilizadas por Hirano.
- (8) Mais tarde identificada por W. T. Swingle como sendo *Afrægle gabonensis* (Swingle), Engler.

Pelos dados do quadro I, verifica-se que, com exceção de duas variedades de *Citrus aurantifolia*, todos os demais tipos examinados por Hirano (gêneros, espécies e variedades) possuem o mesmo número de cromossomos, isto é, $2n=18$. A extrema variabilidade na densidade dos estomas deve, portanto, ser atribuída, de preferência, às diferenças genéticas existentes, o que, aliás, é perfeitamente compreensível, dada a extrema variabilidade dos caracteres morfológicos e fisiológicos que se constata nos representantes de *Citrus* e demais gêneros das *Aurantioideæ*. O elevado grau de heterozigose verificado em muitas espécies de *Citrus* deve ser também responsável, em parte, pelas diferenças encontradas na densidade dos estomas, pois muitas das variedades deste gênero se originaram por "seedlings" ocasionais derivados de autofecundações ou hibridações naturais.

Examinemos, ainda, alguns casos em particular:

Citrus aurantifolia: As diferenças na densidade dos estomas, observadas entre o grupo das duas primeiras variedades (Bearss e Tahiti) e as duas outras (Kusai e Mexican) devem ser atribuídas, em grande parte, ao fato de aquelas serem triplóides e estas diplóides. A "Tahiti" provavelmente se deriva de uma lima ácida diplóide, cujos frutos os Estados Unidos importaram do Tahiti (15, 7), tendo-se originado a "Bearss" da "Tahiti", provavelmente, por um "seedling" nucelar (7). A diferença extremamente pequena, do número de estomas encontrados entre estas duas variedades, está, pois, plenamente explicada. Quanto à *Kusai Lime*, que destoa um tanto do grupo, cumpre notar que a sua posição na sistemática de *Citrus* ainda não está bem definida; Nakamura (9) a menciona como pertencente ao *C. limonia* e Webber (16) a classifica provisoriamente no grupo das "mandarins-limes" e *C. reticulata* Blanco. Não pertencendo, pois, ao *C. aurantifolia*, fica explicada a diferença no número dos seus estomas, quando comparada com a "Mexican Lime".

C. hystrix: A grande diferença encontrada entre os números de estomas nas duas espécies citadas por Hirano se explica pelo fato de divergirem elas profundamente sob ponto de vista morfológico, tendo sido a primeira (CES 432) recentemente classificada por Swingle como pertencendo ao *C. macroptera* Montr.

C. limonia: Das quatro variedades citadas, a que apresenta o menor número de estomas também destoa mais sob ponto de vista morfológico com frutos de coloração amarelo-alaranjada, casca solta e rugosa, tendo mesmo sido citada por Nakamura (9) como pertencendo a uma espécie distinta (*C. verucosa* Hort. ex Tanaka ?). Chama-nos ainda a

atenção a grande diferença no número de estomas encontrado para as variedades "Eureca" e "Lisbon", morfológicamente muito semelhantes.

C. nobilis : Trata-se de um dos grupos mais heterogêneos de *Citrus*; dos seis tipos estudados por Hirano — todos com $2n=18$ — apenas as variedades "Kunembo" e "King" pertencem a esta espécie, de acordo com Swingle (13) ; o "Kinokuni", mencionado por Nakamura (9) como espécie diferente, e as demais pertencendo ao *C. reticulata* Blanco. Entretanto, mesmo reagrupando-se estes tipos, de acordo com o critério acima, nota-se que são grandes as diferenças do número de estomas, mesmo dentro destes sub-grupos.

C. medica : O grupo das quatro variedades estudadas também se apresenta bem heterogêneo ; apenas a última citada (Italian Citron) constitui uma cidra típica, apresentando as demais frutos de coloração amarelo-alaranjada de várias formas e tamanhos.

C. sinensis : Todas as seis variedades são, aparentemente, diplóides, sendo, entretanto, acentuadas as diferenças morfológicas que apresentam.

Os demais gêneros mencionados no fim do quadro I são todos diplóides, caracterizando-se, entretanto, por profundas diferenças no seu tipo de crescimento e demais caracteres morfológicos e fisiológicos.

Em conclusão, pode-se, pois, afirmar que apenas em um dos grupos estudados (*Citrus aurantifolia*) é possível explicar as variações da densidade de estomas por diferenças no número de cromossomos.

NÚMERO DE CROMOSSOMOS E TAMANHO DOS ESTOMAS

Como já foi dito atrás, a finalidade principal deste estudo constitui uma tentativa de se delinear um método simples para diferenciar mudas triplóides e tetraplóides que, com certa frequência, aparecem nos viveiros de *Citrus*.

1) Material e métodos

O material utilizado para determinação do tamanho dos estomas nos foi gentilmente fornecido pelo dr. H. B. Frost, do Departamento de Plant Breeding da Citrus Experiment Station, Riverside, Califórnia, com exceção do "Grapefruit McCarty" e o hipertriplóide, "Citron of Commerce", ambos existentes na coleção de *Citrus* da Estação Experimental de Limeira, do Instituto Agrônomo. Todas as determinações do número de cromossomos já tinham sido feitas anteriormente por Frost, no material de Riverside, e por Bacchi, no de Limeira.

Pela determinação do tamanho dos estomas, foram colhidas cerca de 20 folhas desenvolvidas, aproximadamente do mesmo tamanho e expostas ao sol, da face sul de cada uma das árvores, escolhidas para tal fim, da coleção de *Citrus* de Riverside. As de Limeira foram cole-

tadas da mesma maneira, apenas de todos os lados das árvores. Levadas sem demora ao laboratório, ali se escolhiam as 10 mais uniformes de cada lote, cortando-se de cada folha um setor central e transversal de 2,5 cm de largura (fig. 1); tais setores eram fixados em solução "F-A-A" (Formalina: 5 cc; Ac. acético glacial: 5 cc; Alc. etílico 70%: 90 cc) por 24 horas; depois o fixador era substituído pelo álcool etílico 70%. Para exame dos estomas, foram feitos à mão livre, com auxílio de uma lâmina "gilette", 5 cortes, tangenciais, na epiderme inferior de cada setor, examinando-se, a seguir, estes cortes montados sob lamínula e em água destilada. Utilizou-se, para tal fim, um microscópio Zeiss com objetiva de imersão 100 x e ocular milimetrada 7 x. Em cada corte foram feitas determinações em 4 estomas, medindo-se seu comprimento e largura. Tendo-se feito 5 cortes por folha e examinado, da mesma forma, 10 folhas, deduz-se que para cada planta foram executadas medições em 200 estomas. Para as medições evitavam-se sempre os estomas de tamanho muito maior, já descritos por Reed e Hirano (12), sendo, porém, os demais escolhidos ao acaso.

Para cada folha foi computada uma média da área dos estomas, calculando-se depois uma média geral para cada uma das plantas, baseada nas 10 médias parciais. A área foi calculada da seguinte forma: o produto comprimento x largura, em unidades da ocular, foi multiplicado por 0,785, admitindo-se que o estoma seja uma elipse; em seguida multiplicou-se este produto por 2,776 para transformar a área calculada em micra². Para cada indivíduo também se efetuou a análise da variance, e a determinação de "F" com o fim de saber se as médias gerais podiam ser consideradas como representativas do material em estudos. Das 36 análises feitas, 10 apresentaram um erro "dentro" maior do que "entre" e apenas 7 revelaram um valor de "F" acima do da tabela, sendo 6 para $P=5\%$ e 1 para $P=1\%$. A grande maioria das médias pode, pois, ser considerada como bem representativa, tendo sido, no geral, não significativa tanto a variação "entre" as folhas como "dentro" das folhas.

2) Resultados gerais obtidos

No quadro II apresentamos os resultados gerais das medições feitas:

No quadro II e no gráfico 1 o material examinado foi coordenado em ordem decrescente de tamanho dos seus estomas, verificando-se

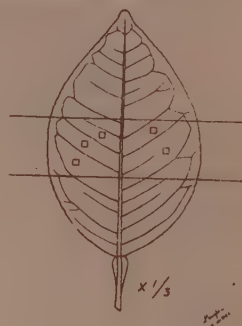


Fig. 1

Folha indicando o setor utilizado e a localização aproximada dos cortes tangenciais da epiderme.

QUADRO II
TAMANHO DOS ESTOMAS EM FORMAS CÍTRICAS DI-TRI- E TETRAPLÓIDES

N.º	Localização na C.E.S. (*)	V A R I E D A D E S	Espécies	N.º de cromossomos	Área dos estomas em micra ²
42	SI-C1, 6	Imperial Grapefruit	<i>Citrus paradisi</i>	4x	402,1 ± 3,00
74	SI-G4, 14	King Mandarin	<i>C. nobilis</i>	4x	395,6 ± 2,42
45	SI-D3, 13	Hall Silver Grapefruit	<i>C. paradisi</i>	4x	389,3 ± 2,83
71	SI-D3, 10	Willow Leaf Mandarin	<i>C. paradisi</i>	4x	389,2 ± 3,28
	P-2-18A(**)	Grapefruit Mc Carly	<i>C. reticulata</i>	4x	387,8 ± 2,39
69	SI-D1, 15	Dancy Tangerine	<i>C. reticulata</i>	4x	384,5 ± 3,86
64	SI-D2, 8	Ruby Orange	<i>C. sinensis</i>	4x	376,3 ± 2,08
62	SI-D11, 9	Paper Rind Orange (St. Michael)	<i>C. sinensis</i>	4x	376,1 ± 2,28
73	SI-D6, 15	Seedy Marsh Grapefruit	<i>C. paradisi</i>	4x	360,8 ± 2,28
58	SI-C12, 1	Imperial Grapefruit (41) x Willow Leaf Mandarin (70)	<i>C. paradisi</i> x <i>C. reticulata</i>	3x	349,4 ± 2,08
S9	SI-C12, 4	Maltese Oval Orange (60) x Seedy Marsh Grapefruit (72)	<i>C. sinensis</i> x <i>C. paradisi</i>	3x	334,7 ± 2,19
55	SI-C11, 8	Maltese Oval Orange (60) x King Mandarin (75)	<i>C. sinensis</i> x <i>C. nobilis</i>	3x	329,5 ± 3,28
53	SI-C11, 13	Maltese Oval Orange (60) x Leaf Mandarin (70)	<i>C. sinensis</i> x <i>C. reticulata</i>	3x	325,7 ± 2,47
11	3A-26, 3	Bearss Seedless Lime	<i>C. aurantiifolia</i>	3x	321,2 ± 1,83
	—	"Citron of Commerce" (**)	não determinada	3x+1	315,6 ± 1,61
12	3A-23, 3	Tahiti Lime	<i>C. aurantiifolia</i>	3x	307,7 ± 2,30
54	SI-C11, 11	Maltese Oval Orange (60) x King Mandarin (75)	<i>C. sinensis</i> x <i>C. nobilis</i>	3x	306,6 ± 2,64
57	SI-C11, 3	Maltese Oval Orange (60) x Naletille Orange	<i>C. sinensis</i> x <i>C. sinensis</i>	3x	302,4 ± 2,19
56	SI-C11, 6	Willow Leaf Mandarin (70) x Ruby Orange (65)	<i>C. reticulata</i> x <i>C. sinensis</i>	3x	293,6 ± 1,52
52	SI-C10, 13	Willow Leaf Mandarin (70) x Dancy Tangerine (68)	<i>C. reticulata</i> x <i>C. reticulata</i>	3x	282,8 ± 1,52
47	3A-10, 2	Indian Citron	<i>C. medica</i>	2x	263,3 ± 1,67
41	SI-C1, 5	Imperial Grapefruit	<i>C. paradisi</i>	2x	262,1 ± 1,89
44	P2-19A(**)	Grapefruit McCarly	<i>C. paradisi</i>	2x	260,0 ± 1,75
43	SI-C10, 9	Hall Silver Grapefruit	<i>C. paradisi</i>	2x	257,6 ± 2,47
61	SI-C9, 1	Lisbon Lemon	<i>C. limon</i>	4x	254,3 ± 2,36
67	SI-D11, 13	Lisbon Lemon	<i>C. limon</i>	2x	252,1 ± 1,83
68	SI-D1, 14	Dancy Tangerine	<i>C. limon</i>	4x	250,1 ± 1,86
70	SI-D3, 9	Willow Leaf Mandarin	<i>C. reticulata</i>	2x	248,2 ± 2,05
65	SI-D12, 6	Ruby Orange	<i>C. reticulata</i>	2x	246,2 ± 1,97
60	SI-D11, 15	Maltese Oval Orange	<i>C. sinensis</i>	2x	246,1 ± 1,64
75	SI-G4, 16	King Mandarin	<i>C. sinensis</i>	2x	244,8 ± 1,72
72	SI-D6, 10	Seedy Marsh Grapefruit	<i>C. nobilis</i>	2x	244,3 ± 1,61
63	SI-D11, 8	Paper Rind Orange (St. Michael)	<i>C. paradisi</i>	2x	243,3 ± 1,55
66	SI-D10, 12	Lisbon Lemon	<i>C. sinensis</i>	2x	241,3 ± 1,58
—	2-E32, 15	Naletille Orange	<i>C. limon</i>	2x	234,8 ± 1,78
			<i>C. sinensis</i>	2x	219,9 ± 1,56

M = 384,6 ± 1,69

M = 315,4 ± 1,86

M = 248,0 ± 0,56

(*) C.E.S. = Citrus Experiment Station, Riverside, Califórnia.
(**) Obtidas na Est. Exp. de Limeira, São Paulo.

que êste variou entre os extremos de 402,1 micra² para o "Imperial Grapefruit", e 219,9 micra² para a "Nafertile Orange", acusando, pois, êste caráter uma grande variabilidade neste gênero.

3) Comparação entre grupos di- tri- e tetraplóides

Classificado o material na ordem acima mencionada, destacam-se em três grupos distintos, os di- tri- e tetraplóides, apresentando médias gerais de, respectivamente, 248,0 micra², 315,4 micra² e 384,6 micra². Comparando-se a variabilidade **dentro** de cada um dêstes três grupos, verificou-se que o valor de **F** é maior no caso dos triplóides, sendo, entretanto, também significativo para os outros dois grupos. Apesar-de se constatar uma gradual diminuição da área dos estomas, do tetraplóide com área máxima até o diplóide de área mínima, não se verificou nos limites tetra- e triplóide e tri- e diplóide uma transgressão dos dados obtidos; apenas duas exceções se registaram: os ns. 43 e 67 "Lisbon Lemon", que, segundo Frost (inf. verbal), são dois enxertos procedentes de borbulhas derivadas de um único "seedling" nucelar tetraplóide. As fôlhas dêstes dois pés são grossas e coriáceas, idênticas aos demais tetraplóides até hoje estudados. Talvez êstes indivíduos representem uma quimera com uma epiderme diplóide, sendo o restante do tecido tetraplóide, como já verificado por Frost e Krug (4) em material de *Citrus* de outra constituição. Interessante é notar que o grupo triplóide, apesar-de genêticamente muito variável, pois encerra, além de 8 híbridos diversos, duas variedades triplóides de *C. aurantifolia* e um hipertriplóide ($3x + 1$), o "Citron of Commerce", se apresenta relativamente homogêneo.

As diferenças encontradas entre as três médias gerais, correspondentes aos grupos di- tri- e tetraplóides, são altamente significantes:

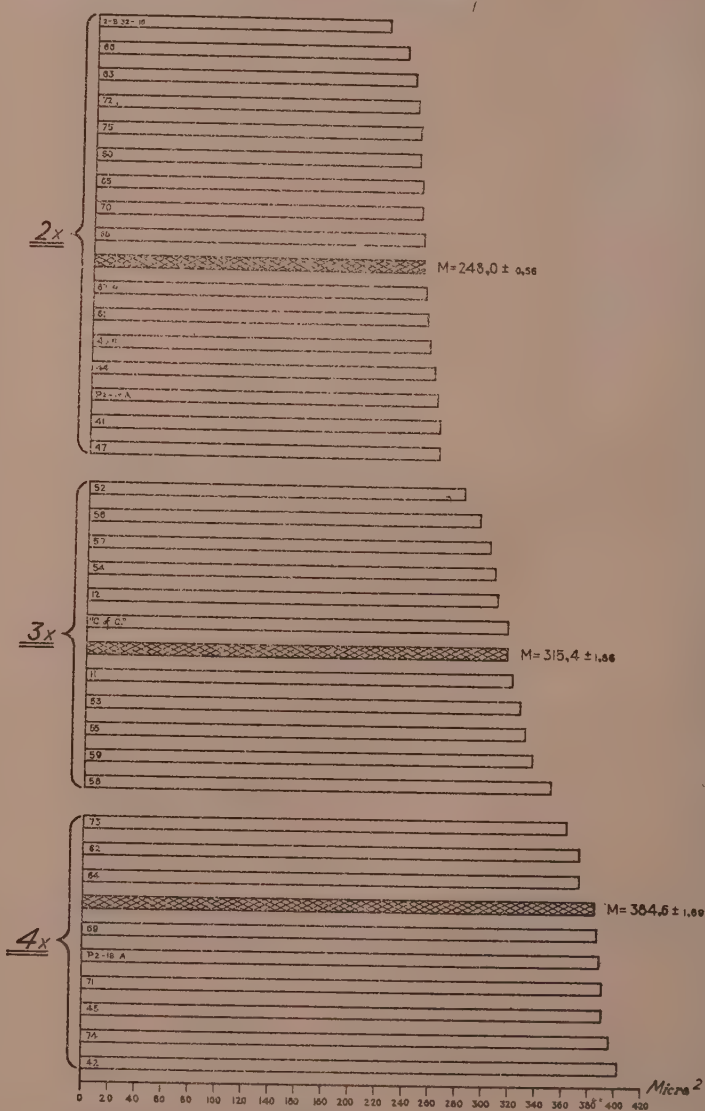
	Diferenças (micra ²)	t
Tetraplóide e Triplóide :	69,2	27,6
Tetraplóide e Diplóide :	137,2	76,7
Triplóide e Diplóide :	68,0	34,7

Valores máximos de t da tabela ($nf = \infty$) $P=5\%$: 2,58
 $=2\%$: 2,33
 $=1\%$: 1,96

Analisando-se também as diferenças encontradas, respectivamente, entre o tetraplóide de área mínima e o triplóide de área máxima e ainda entre o triplóide de área mínima e o diplóide de área máxima, verifica-se que as duas diferenças encontradas ainda são estatisticamente significantes (respectivamente $D=11,4$; $t=3,7$ e $D=19,5$; $t=7,4$).

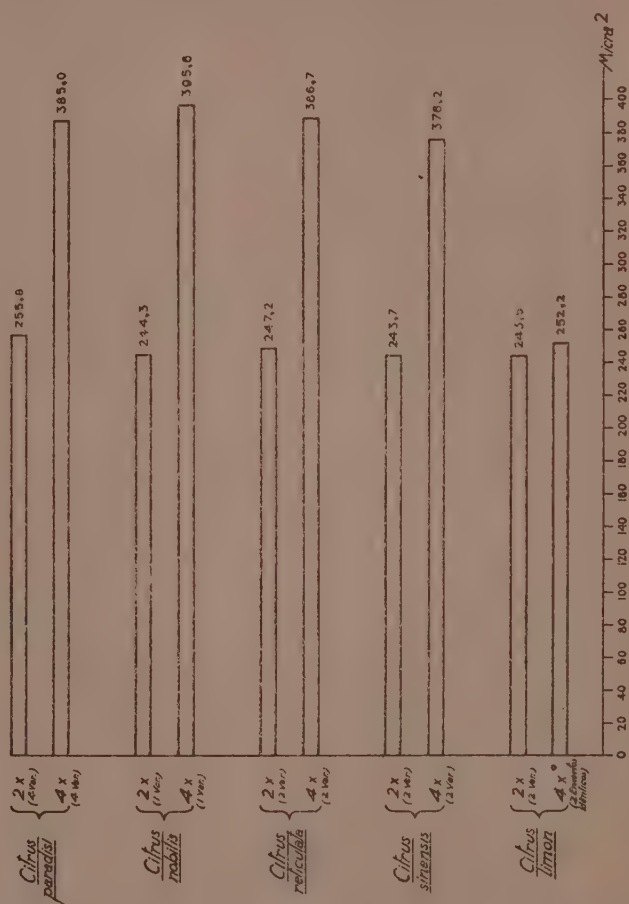
Gráfico nº I

Área dos estomas em formas citricas di-tri-e tetraploides.



* Lidian Lomen 4x, provavelmente com epiderme 2x

Gráfico nº 2
 Comparação da área média dos esômos de di-e-
 tetraplóides da mesma espécie



• Provavelmente com sporopite diploide

4) Comparação entre diplóides e tetraplóides da mesma espécie

Analisando-se, comparativamente, os dados destes grupos, chegou-se à conclusão de que as diferenças existentes, tanto entre pares de indivíduos como entre as médias de diplóides e tetraplóides, dentro de cada espécie, são muito significantes. O material examinado presta-se especialmente para estas comparações, uma vez que o dr. H. B. Frost nos pôs à disposição uma série de indivíduos irmãos, isto é, cada diplóide possui o seu correspondente tetraplóide, ambos sempre originários da mesma planta-mãe; apenas no caso do King Mandarin, o diplóide e o tetraplóide provêm de duas plantas, representando uma delas, entretanto, um enxerto da outra, constituindo, pois, o mesmo material genético. Examinemos, a seguir, o material, separadamente por espécie (quadro III e gráfico 2):

QUADRO III

COMPARAÇÃO DA ÁREA DE ESTOMAS DE DIPLÓIDES E TETRAPLÓIDES DA MESMA ESPÉCIE

ESPÉCIE	VARIEDADE	DIFERENÇA, NA ÁREA, ENTRE DI- E TETRA- PLÓIDES (micra ²)
<i>C. paradisi</i>	Imperial	140,0
	Hall Silver	131,7
	McCarty (1).....	127,0
	Seedy Marsh	117,5
	Média	129,1
<i>C. nobilis</i>	King mandarin (1)	151,3
<i>C. reticulata</i>	Willow Leaf mandarin.....	143,0
	Dancy Tangerine	136,3
	Média	139,7
<i>C. sinensis</i>	Ruby Orange.....	130,2
	Paper Rind Orange	134,8
	Média	132,5
<i>C. limon</i>	Lisbon Lemon	8,7 (2)

(1) Os tetraplóides e diplóides não provêm de uma única planta-mãe.

(2) Diferença estatisticamente não significativa pelo fato de as plantas tetraplóides, possuírem, provavelmente, uma epiderme **diplóide**.

Com exceção do *C. limon*, as diferenças verificadas, entre a área dos estomas dos diplóides e dos tetraplóides, são, pois, bem constantes, oscilando apenas entre os limites de 117,5 a 151,3 micra², sendo sempre estatisticamente significantes.

5) Comparação entre os extremos dentro de cada espécie e grupo di- e tetraplóide

Examinemos ainda a variabilidade dentro de cada um destes grupos :

QUADRO IV

COMPARAÇÃO ENTRE OS EXTREMOS DENTRO DE CADA ESPÉCIE E GRUPO DI- E TETRAPLÓIDE

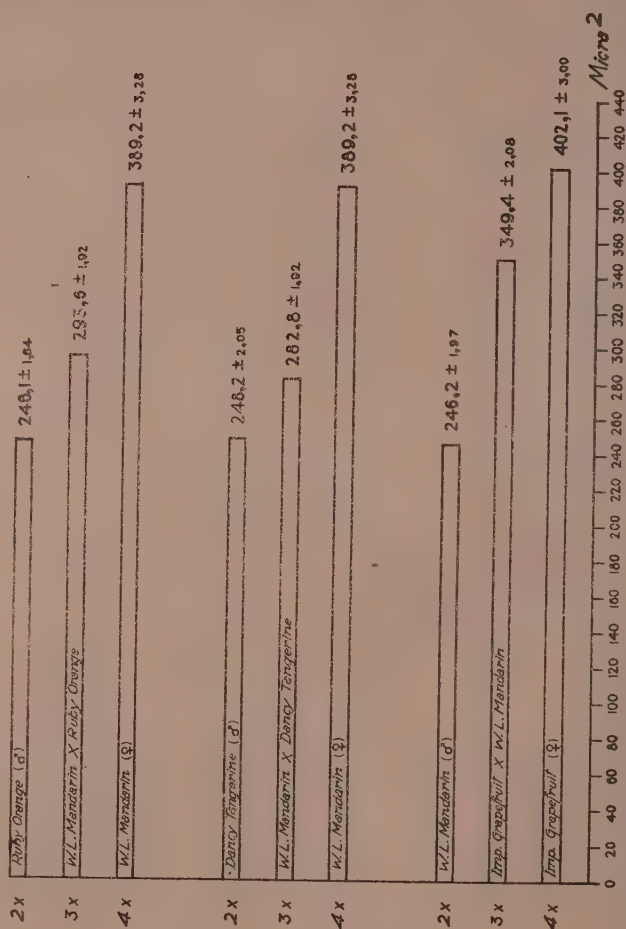
ESPÉCIE	N.º de variedades	N.º de cromossômios	Diferenças entre os extremos (micra ²)	t
<i>C. paradisi</i>	4	2x	18,8	7,7*
	4	4x	41,3	10,9*
<i>C. reticulata</i>	2	2x	2,0	0,69
	2	4x	4,7	0,92
<i>C. sinensis</i>	4	2x	26,2	12,3*
	2	4x	0,2	0,06
<i>C. limon</i>	2	2x	17,3	6,7*
	2	4x	4,2	1,4

Dos oito grupos examinados, quatro apresentam diferenças estatisticamente significantes entre os seus extremos, acusando os demais valores de *t* inferiores aos da tabela, mesmo para $P=1\%$.

6) Comparação entre os híbridos triplóides e os seus ascendentes di- e "tetraplóides"

A-pesar do fato de todos os híbridos triplóides mencionados no quadro II terem sido derivados de cruzamentos entre formas **diplóides**, julgamos ser lícita a comparação entre cada um destes híbridos e as suas respectivas formas parentais diplóides e "tetraplóides", pois aceitamos a hipótese de Frost (3) de que tais híbridos são triplóides, pelo fato de o gameto feminino se derivar de um tecido nucelar tetraplóide, provavelmente originário por mutação somática. O "ascendente" 4x, utilizado para as comparações, é sempre constituído pela forma tetraplóide derivada da mesma progênie da qual provém o respectivo diplóide.

Gráfico no 3
 Comparação da área dos esômatos de três híbridos triploides com a dos seus ascendentes diploides e tetraploides »



Dos oito híbridos triplóides estudados, três podem ser comparados com ambos os ascendentes, os demais apenas com um deles, pois, infelizmente, não existia na coleção de Riverside a forma tetraplóide do "Maltese Oval Orange", que entrou em 5 dêstes cruzamentos como ♀.

Examinemos, no quadro V e no gráfico 3, as diferenças observadas na área dos estomas.

QUADRO V

COMPARAÇÃO ENTRE OS HÍBRIDOS TRIPLÓIDES E OS SEUS ASCENDENTES DI-
E "TETRAPLÓIDES"

N.º	V A R I E D A D E S	N.º de cromos.	Diferenças na área (micra ²)	t
65	Ruby Orange (♂).....	2x	47,5	18,8
56	Willow Leaf Mandarin x Ruby Orange	3x	95,6	25,2
71	Willow Leaf Mandarin (♀).....	4x		
68	Dancy Tangerine (♂).....	2x		
52	Willow Leaf Mandarin x Dancy Tangerine ..	3x	34,6	12,3
71	Willow Leaf Mandarin (♀).....	4x	106,4	28,0
70	Willow Leaf Mandarin (♂).....	2x		
58	Imperial Grapefruit x Willow Leaf Mandarin.	3x	103,2	36,1
42	Imperial Grapefruit (♀).....	4x	52,7	14,4
55	Maltese Oval Orange x King Mandarin	3x	85,2	23,3
75	King Mandarin (♂).....	2x		
53	Maltese Oval Orange x Willow Leaf Mandarin..	3x	79,5	25,2
70	Willow Leaf Mandarin(♂).....	2x		
54	Maltese Oval Orange x King Mandarin	3x	62,3	20,2
75	King Mandarin(♂)	2x		
57	Maltese Oval Orange x Nafertile Orange....	3x	82,5	32,0
—	Nafertile Orange(♂)	2x		
59	Maltese Oval Orange x Seedy Marsh Grapefruit	3x	91,4	34,1
72	Seedy Marsh Grapefruit(♂)	2x		
55	Maltese Oval Orange x King Mandarin	3x	22,9	5,44
54	Maltese Oval Orange x King Mandarin	3x		

Sem uma única exceção, tôdas as diferenças constatadas são estatisticamente significantes. O valor de *t* foi apenas igual a 5,44, no caso da comparação da área dos estomas de dois indivíduos híbridos triplóides (Maltese Oval Orange x King Mandarin) da mesma ascendência.

7) Discussão

Analizando-se os dados obtidos, chega-se à conclusão de que os três grupos di- tri- e tetraplóides apresentam áreas médias de estomas bem diferentes; nos limites dos grupos, di- e triplóides e também tri- e tetraplóides, entretanto, as diferenças observadas são menores do que as dentro de cada um deles. Comparando-se, porém, os representantes di- e tetraplóides de cada uma das variedades observadas, notam-se apreciáveis diferenças, que, para o material examinado, variaram entre 117, 5 a 151,3 micra². Mesmo que não haja dúvida de que um determinado indivíduo seja tetraplóide, a determinação da área dos estomas servirá, pois, para confirmar tal hipótese ou revelará que a folha, a-pesar-de ser grossa e coriácea, possui aparentemente uma epiderme diplóide, como, provavelmente, é o caso dos dois indivíduos "Lisbon Lemon" (ns. 43 e 67) examinados.

Pelo quadro IV verifica-se ainda que a área dos estomas é também variável dentro da mesma espécie e grupo di- e tetraplóide, quando se comparam, neste sentido, variedades diferentes. As diferenças encontradas não são, entretanto, estatisticamente significantes em metade dos casos examinados.

A possibilidade de se poder diferenciar **triplóides** de diplóides e tetraplóides é para o geneticista e melhorador de plantas cítricas ainda mais importante do que diferenciar tetraplóides dos diplóides. Comparando-se os dados dos quadros III e V, nota-se, como era de se esperar, que as diferenças entre os triplóides e os seus respectivos di- e tetraplóides são bem menores do que aquelas entre di- e tetraplóides. Êstes resultados indicam que a determinação da área dos estomas numa planta de constituição citológica desconhecida resolverá, com razoável grau de certeza, se ela é tri- ou tetraplóide, baseando-se nas diferenças encontradas quando comparada com a área do respectivo diplóide, pois, no material ora examinado, a diferença **máxima** di- a triplóide (103,2 micra², Willow Leaf Mandarin 2x e Imperial Grapefruit x Willow Leaf Mandarin 3x), não atingiu a diferença **mínima** di- a tetraplóide (117,5 micra² para o Seedy Marsh Grapefruit).

Conclue-se, pois, que a determinação da área dos estomas pode ser útil ao geneticista para diferenciar as plantas di- tri- e tetraplóides, mesmo no grupo de plantas cítricas, extremamente variável sob todos os pontos de vista.

RESUMO

No presente trabalho dois aspectos diversos são analisados referentes às relações entre poliploidia e os caracteres dos estomas em *Citrus* e outros gêneros próximos. Na primeira parte analisam-se os dados apresentados por Hirano (5) sobre a densidade dos estomas em numerosos representantes da sub-família das *Aurantioideæ* à luz da sua constituição citológica. Esperava-se poder explicar a grande variabilidade desta densidade, pela possível existência de formas poliplóides. A contagem dos cromossômios de muitas plantas por êle utilizadas na Estação Experimental de Riverside, Califórnia, e uma extensa pesquisa bibliográfica, visando esclarecer a constituição cromossômica daquelas variedades, espécies e gêneros que não puderam ser analisados, revelaram, porém, que, provavelmente, apenas no grupo de *Citrus aurantifolia* Swingle, existem duas variedades triplóides, sendo tôdas as demais diplóides. Sòmente naquele caso é que a variabilidade na densidade dos estomas pôde ser explicada pela diferença no número de cromossômios. No restante do material estudado por Hirano, as diferenças no número de estomas por unidade de área devem ser atribuídas, de preferência, à grande variabilidade da constituição genética.

Na segunda parte apresentam-se os resultados de uma detalhada análise sobre a área dos estomas e a sua variabilidade em formas cítricas di- tri- e tetraplóides, numa tentativa de separar êstes poliplóides sem recorrer à contagem dos cromossômios. Um total de 36 indivíduos pertencendo a 5 espécies diferentes foram estudados. Agrupando-se os valores obtidos em ordem decrescente de área dos estomas, verifica-se uma série contínua, associando-se, entretanto, os di- tri- e tetraplóides em três grupos separados. Notaram-se diferenças estatisticamente significantes tanto entre as médias dos três grupos, como entre os limites extremos de grupos consecutivos e também dentro dêles. A variabilidade dêste caráter também se manifesta dentro de cada uma da maioria das espécies e grupos di- e tetraplóides. Apesar disso, entretanto, chegou-se à conclusão de que a determinação da área dos estomas poderá ser útil mesmo no caso em que se queira separar triplóides de tetraplóides, da mesma progênie, conhecendo-se a área dos estomas das respectivas formas diplóides em idênticas condições de meio.

AGRADECIMENTOS

Agradecimentos são devidos ao dr. H. B. Frost, da Citrus Experiment Station, Riverside, Califórnia, por ter gentilmente pôsto à disposição das pesquisas atrás relatadas variado material da sua valiosa coleção

de *Citrus*; ao dr. L. D. Batchelor, diretor daquela Estação Experimental, por ter facilitado a execução do início destas investigações, e ao sr. Francisco Juliano Filho, da Secção de Citologia do Instituto Agrônômico, pelo auxílio que prestou na determinação de área dos estomas.

SUMMARY

In the present article two aspects dealing with the relations of polyploidy and stomata characters in *Citrus* and related genera are dealt with. First the data of Hirano (5) concerning stomata density in numerous forms of the sub-family *Aurantioideæ* are analysed in relation to their chromosomal constitution. It was thought that the great variability of stomata number per unit area, could possibly be explained by differences in chromosome numbers. Chromosome counts of numerous plants utilized by Hirano at the Citrus Exp. Sta., Riverside, California, were made and all available bibliographical informations concerning the cytological constitution of those species and genera were gathered, whose chromosomes could not be counted at Riverside; it was concluded that all types studied by Hirano, have 18 somatic chromosomes except for two varieties of *Citrus aurantiifolia*, Swingle, which are triploid. This was the only instance in which differences in chromosome numbers were primarily responsible for the differences in stomata density. In the rest of the material the variability of this character must be due to differences in genetic constitution.

In the succeeding chapters the results of a detailed analysis of stomata area and its variability in diploid, triploid and tetraploid *Citrus* forms are presented; this was done in order to find a simple method of identifying these, polyploids without making actual chromosome counts. A total of 36 individuals of 5 different species were examined. Listing the average stomata areas, starting with the largest and finishing with the smallest, a continuous series is obtained, the diploids, triploids and tetraploids being however associated in three groups, no overlapping from one group to the other having been noticed. Significant differences have been found not only between the general averages of the three groups, but also between the extremes at the limits of two succeeding groups and also in each of them. Conspicuous variability of this character is also noticed in each of most of the species and its diploid and tetraploid groups. In spite of this variability it is concluded that the determination of stomata area can be useful to geneticists and plant breeders working with *Citrus*, even when one has to distinguish between triploids and tetraploids in the same progeny, if one knows the stomata area of the related diploids grown under identical circumstances.

LITERATURA CITADA

1. Bacchi, O. Observações citológicas em *Citrus*. I. Número de cromossomos de algumas espécies e variedades. *Jornal de Agronomia, Piracicaba*, 3: 249-258. 1940.
2. Frost, H. B. The chromosomes of *Citrus*. *Jour. Wash. Acad. Sci.* 15: 1-3. 1925.
3. Frost, H. B. The Genetics and Cytology of *Citrus*. *Current Science Special Number on Genetics*. 1938.
4. Frost, H. B. e C. A. Krug. Diploid — Tetraploid periclinal chimeras as bud variants in *Citrus*. *Genetics* 27: 619-634. 1942.
5. Hirano, E. Relative abundance of stomata in *Citrus* and some related genera. *Bot. Gaz.* 92 (3): 296-310. 1931.

6. **Krug, C. A.** Chromosome numbers in the sub-family Aurantioideae with special reference to the genus *Citrus*. *Bot. Gaz.* **104** (4) : 602-611. 1943.
7. **Krug, C. A. e O. Bacchi.** Triploid *Citrus* Varieties. *Jour. Heredity* **34** (9) : 277-283. 1943.
8. **Longley, A. E.** Polycary, polyspory and polyploidy in *Citrus* and *Citrus* relatives. *Jour. Wash. Acad. Sci.* **15** : 347-351. 1925.
9. **Nakamura, Miyewo.** A preliminary report on the chromosome number, pollen sterility and the formation of abnormal pollen tetrads in *Citrus*. *Bull. Kagoshima Coll. Agr. For.* **1** : 11-14. 1934.
(*Cit. Plant Breed. Abstr.* **7** : 234. 1937).
10. **Oppenheim, J. D. e O. H. Frankel.** Investigations into the fertilization of the Jaffa Orange. *Genetica* **11** : 369-374. 1929.
11. **Osawa, J.** Cytological and experimental studies in *Citrus*. *Jour. Coll. Agr. Imp. Univ. Tokyo* **4** : 83-116. 1912.
12. **Reed, H. S. e E. Hirano.** The density of stomata in *Citrus* leaves. *Jour. Agr. Res.* **43** (3) : 209-222. 1931.
13. **Swingle, W. T.** The Botany of *Citrus* and its wild relatives. In Webber, H. J. et al. *The Citrus Industry*. Univ. of California Press, Berkeley. 1943.
14. **Turrell, F. M. e L. J. Klotz.** Density of stomata and oil glands and incidence of water spot in the rind of Washington Navel Orange. *Bot. Gaz.* **101** (4) : 862-871. 1940.
15. **Webber, H. J.** Limes (Trabalho mimeografado). *Citrus Exp. Sta. Riverside, Califórnia*, 1940.
16. **Webber, H. J.** *The Citrus Industry*. Vol. I. Chapter III. Univ. of California. Press 1943.

Nota : Infelizmente não foi possível aos autores obter uma cópia do trabalho de **Lapin, V. K. and V. G. Telouch** : Size and number of stomata in diploid and polyploid forms in *Citrus*, *Poncirus* and *Fortunella*. *Compt. Rend. (Dok.) Acad. Sci. U.S.S.R.* **27** (4) : 365-368. III. 1940 — *Biol. Abstr.* **15** (6) : 11781. 1941.

QUIMERAS PERICLINAIS DIPLÓIDES-TETRAPLÓIDES SURGIDAS EM FORMA DE VARIAÇÕES SOMÁTICAS EM *CITRUS* (*)

H. B. Frost (**)

C. A. Krug (***)

INTRODUÇÃO

Numerosas variações genéticas, afetando diversas partes de plantas cítricas, têm sido constatadas em culturas destas árvores frutíferas. "Variações de borbulha" ou "mutações de borbulha" (mutações somáticas) têm sido largamente estudadas, do ponto de vista hortícola, em diversas variedades comerciais, como, por exemplo, nos limões "Eureca" e "Lisboa" (23), mas pouco se sabe ainda a respeito das verdadeiras causas destas modificações hereditárias.

Certas formas de mutações somáticas, que se caracterizam por tecidos de constituição mista, como certos limoeiros que ostentam folhas de margens brancas (21) e laranjeiras apresentando dois tipos de casca nos seus frutos (22), constituem, aparentemente, quimeras periclinais, que encerram o tipo original como um dos seus componentes. Em outros casos, como acontece com a variedade Wase Satsuma, de importância econômica (24), parece duvidoso se as freqüentes reversões somáticas de tal variação ao seu tipo primitivo devem ser atribuídas a uma constituição original quimérica ou à instabilidade genética do mutante.

A extraordinária diversidade das formas cítricas e a pronunciada heterozigose, que parece ser generalizada neste gênero (25, 7), sugerem que as mutações de gens ocorrem com relativa freqüência. Este processo, portanto, pode ser considerado como uma das prováveis causas das variações somáticas em *Citrus* apesar de se tornar difícil discerní-

(*) Tradução, ligeiramente ampliada, do original publicado em Genetics 27 : 619-634. 1942 (publicação n.º 464 da University of California Citrus Experiment Station, Riverside, California).

(**) Associate Plant Breeder da Citrus Experiment Station, Riverside, California.

(***) Pesquisa realizada por este autor, em 1941, naquela Estação Experimental, em virtude de ter recebido uma bolsa de estudos da John Simon Guggenheim Memorial Foundation.

lo dos casos de ocorrência de "crossing-over" somático ou de anomalias estruturais nos cromossomos.

Variações "gêmeas", às vezes afetando os caracteres da casca e que modificam setores adjacentes em direções opostas em relação à expressão original do respectivo caráter, também têm sido observadas. Estas sugerem a ocorrência de uma mitose anormal. Quando, tanto a espessura da casca como também a sua coloração são modificadas em direções opostas em dois setores adjacentes, o que já tem sido observado, deve ter ocorrido uma mudança no mecanismo citológico de tal ordem a afetar, no mínimo, a posição de dois gens. Além dos casos acima mencionados (inclusive das transferências de camadas geratrizes nas quimeras), a natureza exata das variações de borbulha em *Citrus*, somente poderá ser determinada quando uma alteração citológica visível estiver envolvida.

Quanto às causas das variações somáticas em *Citrus*, evidentemente, apenas as mudanças do número de cromossomos podem ser facilmente determinadas. Microsporocitos e pontas de raízes de estacas revelam o número de cromossomos de apenas duas camadas geratrizes, das quais eles se derivam. Estas contagens, nos casos de mutações somáticas, precisam ser completadas, de preferência, pela determinação direta ou indireta do número de cromossomos na epiderme derivada da primeira camada geratriz. Estas investigações detalhadas são necessárias para se poder distinguir entre variações totalmente modificadas e quimeras.

Durante os últimos anos muitas investigações têm sido realizadas, com o fim de determinar o número de camadas geratrizes existentes nos primórdios das plantas. Schmidt (20) propôs a teoria do "tunica-corpus", que apenas considera a existência de duas regiões geratrizes principais, ao passo que Foster (4, 5) demonstrou que o número de camadas geratrizes, que tomam parte no desenvolvimento dos diversos tecidos, varia consideravelmente de espécie para espécie. Blakeslee et al (1) e Satina et al (18, 19), trabalhando com várias quimeras de *Datura*, induzidas pela Colchicina, demonstraram claramente que três camadas geratrizes tomam parte no desenvolvimento desta planta. Aparentemente, nada se sabe, ainda, a este respeito, com relação ao gênero *Citrus*.

Apenas poucas determinações do número de cromossomos têm sido feitas, até hoje, em formas cítricas que se originaram por variações somáticas. Nakamura (14) examinou microsporocitos de dois ramos mutantes da Satsuma, conhecida por Wase. Ele encontrou o mesmo

número de cromossômios ($2n=18$) nestes ramos e na parte normal da árvore em questão, não notando, igualmente, diferenças no comportamento destes cromossômios. A laranja Shamouti, da Palestina, que, provavelmente, se originou da laranja Belladi por mutação de borbulha, e que freqüentemente produz ramos do tipo da Belladi (15), também possui o número normal de cromossômios nos seus microsporocitos (16).

Pelo menos, sob determinadas condições climáticas, a tetraploidia é comum em "seedlings" produzidos por via agâmica (por embriões nucelares) e descendentes de plantas diplóides de muitas variedades (6, 8, 13). Considerando-se que plantas triplóides, e não tetraplóides, têm sido encontradas entre mudas de origem reconhecidamente gamética (híbridos F_1 interespecíficos), nas mesmas culturas em que apareciam tetraplóides nucelares, chega-se à conclusão de que a duplicação do número de cromossômios da qual resulta a tetraploidia em mudas de *Citrus*, deve ocorrer, de preferência, antes do início das divisões embriônicas. Os freqüentes casos da produção tanto de mudas tetraplóides como diplóides, pela mesma semente, sugere que a duplicação geralmente ocorre no pistilo e provavelmente no nucelo.

Notícias sobre a existência de ramos tetraplóides em árvores cítricas diplóides, indicando que a tetraploidia se originou em meristemas dos galhos, não parecem ter sido publicadas antes da realização do presente trabalho. Considerando-se os caracteres das árvores originadas por variações somáticas, na Califórnia, conclue-se que variações tetraplóides de borbulha são raras em *Citrus*. No caso apresentado no presente trabalho, pequena parte de uma árvore ("pé franco") era tetraplóide, tendo a mudança do número de cromossômios provavelmente ocorrido após a germinação da semente.

MATERIAL E MÉTODOS

De uma tangerina híbrida, obtida pela polinização da mandarina King pela tangerina Dancy, na Citrus Experiment Station, Riverside, Califórnia, foram obtidas 128 mudas, provenientes de 111 sementes derivadas da polinização aberta. Em janeiro de 1932, quando tais mudas tinham aproximadamente 4 a 4 $\frac{1}{2}$ anos, tôdas estas plantas pareciam idênticas à planta-mãe, quanto ao seu tipo genético, presumindo-se, pois, que tôdas se derivaram, assexuadamente, de embriões nucelares. Em uma destas árvores, entretanto, um pequeno ramo (mais tarde designado por "b"), que se originou do tronco a uma altura de mais ou menos 1 a 1,5 m, produziu 4 ramos laterais, dos quais o maior possuía fôlhas largas e aparentemente grossas, sugerindo tetraploidia. Nenhuma

descrição foi feita para os outros três ramos laterais. Quando, na primeira seguinte, novos brotos e folhas se tinham desenvolvido, procedeu-se a um novo exame do ramo "b". Entre um total de 13 brotos, possuindo, cada um, duas folhas ou mais, apenas um parecia ser diplóide, 10 parecendo ser tetraplóides e 2 possivelmente intermediários. Todo o galho mutado, entretanto, secou após o transplântio da árvore.

O restante desta árvore (designada por "a") parecia ser inteiramente diplóide. As árvores a-1 a a-3, mencionadas mais adiante, foram obtidas pela enxertia de borbulhas colhidas de dois ramos normais bem distantes do ramo "b". Dois pares de árvores (b-1 e b-2; b-3 e b-4) se derivam de borbulhas colhidas em dois ramos novos, não adjacentes, do ramo "b". As árvores a-1 a b-4 estão tôdas enxertadas em cavalos de *Poncirus trifoliata*. A árvore b-5 tem como "cavalo" uma muda de laranja doce, derivando-se a borbulha de um dos brotos acima mencionados. Em 1936 estas mudas foram transplantadas para o pomar, na ordem de a-1 a b-5.

Em agosto de 1940 obtiveram-se estacas, possuindo algumas folhas, de vários ramos terminais de 4 das árvores acima mencionadas: a-1, a-2, b-1 e b-4 e plantadas dentro de um estufim, contendo areia aquecida por uma resistência elétrica; em outubro, do mesmo ano, transplantaram-se, para vasos, várias destas estacas então enraizadas, mantendo-as na estufa.

Em janeiro de 1941, pontas de raízes de várias destas estacas foram fixadas na solução "Craf" (17) durante 24 horas e desidratadas pelo método do álcool butílico terciário (11) e depois incluídas na parafina. Cortes transversais de 6 microns de espessura foram depois coloridos pela hematoxilina de Heidenhain. Todos os desenhos foram feitos com câmara clara, à altura da mesa, com uma ampliação de cerca de 3.900 vezes.

Em abril, do mesmo ano, colheram-se botões florais de vários tamanhos dos pés a-1, b-1 e b-4 (a-2 não possuía então botões, provavelmente devido a um excesso de produção do ano anterior), que foram fixados, durante 12 horas, numa solução contendo 3 partes de álcool e uma de ácido acético e depois conservadas em álcool 70%. Os esfregaços feitos com carnim-acético (solução concentrada em ácido acético a 45%) foram aquecidos, até leve fervura, antes da lутagem. As contagens de cromossômios foram feitas em microsporocitos em divisão com aproximadamente o mesmo aumento usado nas contagens de cromossômios nas pontas de raízes.

Ao mesmo tempo procedeu-se à fixação, em líquido Craf, de pontas de ramos novos, em pleno desenvolvimento, e também de pequenos setores centrais de folhas maduras, que depois foram desidratadas como fôra feito para as pontas de raízes. Êste material também foi seccionado a 8-10 microns e colorido pela hematoxilina.

MORFOLOGIA DAS ÁRVORES ENXERTADAS

Caracteres gerais das plantas e das folhas ; frutificação

Em fevereiro de 1941, os pés a-1 a a-3 apresentavam uma boa carga de frutos (bem apreciável em dois dêles e mais fraca no terceiro), sendo em tudo semelhantes à árvore (pé franco) da qual se derivaram (fig. 1). Dos 5 pés descendentes do ramo "b", os de números b-1 e b-5, principalmente o primeiro, se apresentavam com uma copa relativamente curta e larga, não possuindo mais de 4 frutos cada um ; (os tetraplóides caracterizam-se por uma relativa falta de produtividade) ; b-1, pelo menos, possuía uma folhagem típica dos tetraplóides, apresentando um porte particularmente largo, como resultado da sua ramificação muito baixa (fig. 2). Os pés b-2 a b-4, representando os dois brotos do ramo "b", eram altos e de porte ereto, semelhantes, em sua forma, aos pés a-1 a a-3, sendo, porém, intermediários na sua frutificação (b-2 e b-3 medianamente produtivos e b-4 pouco produtivo) (fig. 3). A maioria, senão tôda a sua folhagem, entretanto, parecia indicar tetraploidia, como acontecia com o pé b-5.

ESPESSURA DAS FÔLHAS

Vinte folhas maduras, aproximadamente do mesmo tamanho, foram colhidas, em abril de 1941, em pontos semelhantes de cada uma das árvores, das quais tinham sido retiradas estacas para enraizamento. Duas medições da sua espessura foram feitas nas proximidades do seu centro, por meio de um micrômetro usado para medir a espessura de lamínulas de vidro, que permitia a medição em centésimos de milímetros. As médias e os seus erros "standard" acham-se no quadro I.

QUADRO I

ESPESSURA DAS FÔLHAS DAS ÁRVORES DAS QUAIS SE RETIRARAM ESTACAS PARA ENRAIZAMENTO

ÁRVORE n.º	ESPESSURA DAS FÔLHAS (mm/100)		
	Médias	Diferenças	Diferença/Erro "standard"
a-1	27,25±0,26		
a-2	27,70±0,44		
b-1	36,32±0,34	8,62	15,4(*)
b-4	37,45±0,31	9,75	18,1(**)

Para a determinação da significância das diferenças, as médias dos pés b-1 e b-4 foram comparadas com a do pé a-2, que apresenta uma média mais elevada e maior variabilidade do que a-1. As folhas de ambas as árvores derivadas do ramo "b" eram significativamente mais grossas do que aquelas dos pés derivados das outras partes normais ("a") da planta primitiva. Por outro lado, a diferença entre os dois pés "b" foi muito pouco significativa e aquela entre as duas plantas "a" não era significativa.

ÍNDICE DAS FÔLHAS

Para a obtenção de uma amostra conveniente destinada à determinação do índice da forma da lâmina foliar (comprimento/largura), tôdas as folhas, ainda existentes nas estacas utilizadas para o enraizamento, foram medidas, descartando-se, apenas, algumas mal conformadas. As médias e seus erros "standard" são apresentadas no quadro II.

(*) A diferença entre a-2 e b-1 é altamente significativa ($t=2,71$ para $n=40$ e $P=0,01$) (10, Tabela 94).

(**) A diferença entre a-2 e b-4 é também altamente significativa. A diferença entre b-1 e b-4 é apenas levemente significativa: $\text{Diferença/Erro "standard"} = \frac{1,13}{0,46} = 2,46$ ($t=2,42$ para $n=40$ e $P=0,02$).



Fig. 1

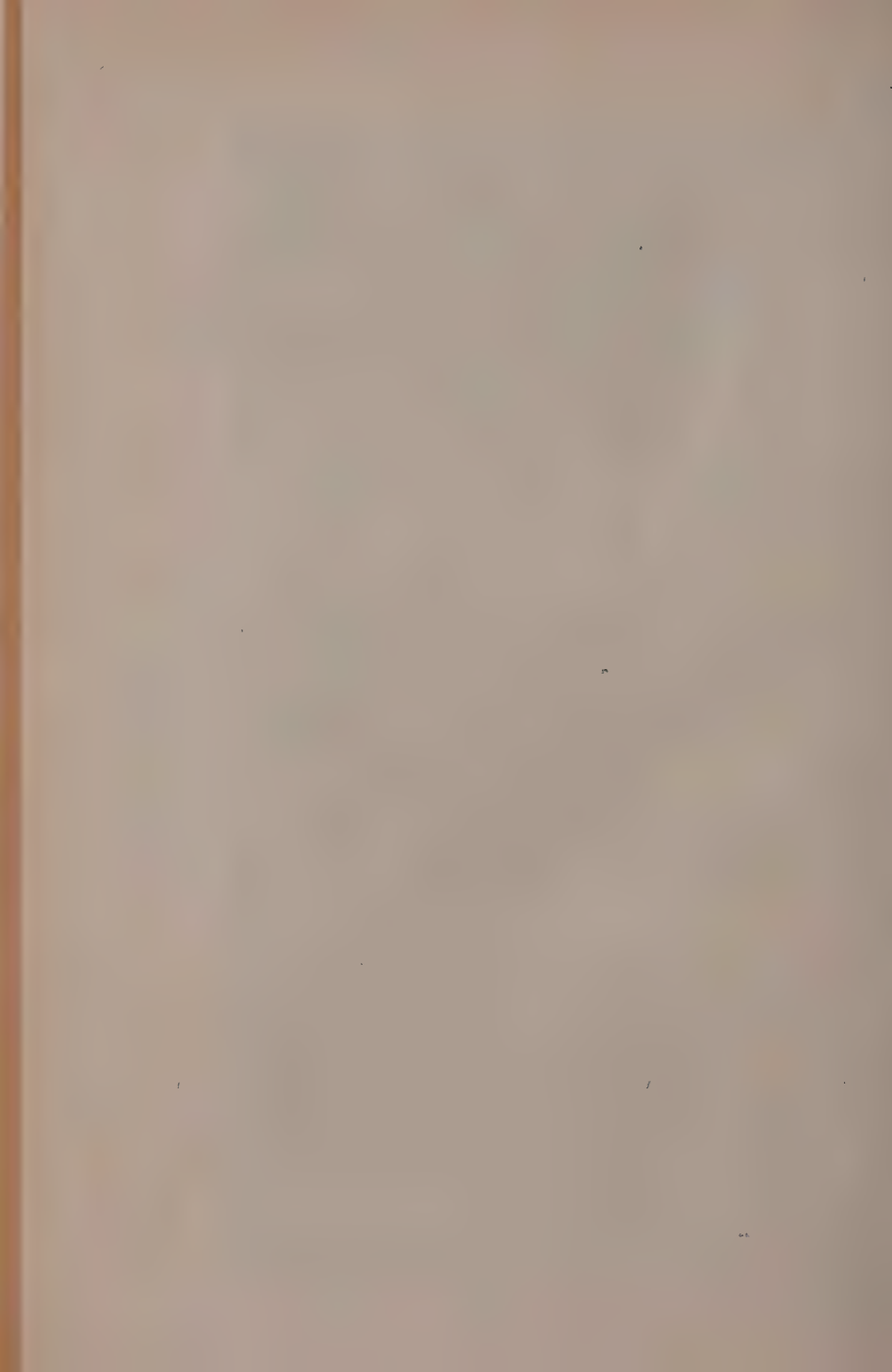
Árvore enxertada a-1, de porte erecto, idêntico ao da planta original.

Fig. 2

Árvore enxertada b-1; a sua folhagem indica tetraploidia. O formato achatado da sua copa foi intensificado pela ramificação muito baixa que se formou após a enxertia.

Fig. 3

Árvore enxertada b-4; quanto ao formato, é semelhante à planta a-1, a maioria da sua folhagem indicando, entretanto, tetraploidia.



QUADRO II

ÍNDICE DA FORMA DAS FÔLHAS DAS ESTACAS ENRAIZADAS

ÁRVORE n.º	NÚMERO DE FÔLHAS	ÍNDICE DA FORMA DA FÔLHA		
		Médias	Diferenças	Diferença/Erro "standard"
a-1 e a-2	23	2,035±0,025		
b-1	19	1,916±0,030	0,119	3,05(*)
b-4	12	1,880±0,032	0,155	3,78(**)

Os resultados obtidos pela medição de amostras de 50 fôlhas, colhidas em outras variedades, e anteriormente estudadas na Citrus Experiment Station, indicam que as diferenças constantes do quadro II, apesar da sua significância estatística, não são altamente significantes, pois são elevadas as probabilidades de serem encontradas tais diferenças entre amostras colhidas em árvores diferentes, mas da mesma constituição genética. As diferenças atrás relatadas indicam, entretanto, maior largura relativa das fôlhas das árvores enxertadas com borbulhas do ramo mutante. Onze formas cítricas tetraplóides, em cultivo na Citrus Experiment Station, acusaram, tôdas, uma largura mais acentuada das suas fôlhas do que os diplóides correspondentes, sendo as diferenças encontradas, em geral, bem maiores do que as enumeradas no quadro II.

CITOLOGIA E HISTOLOGIA

O estudo dos caracteres morfológicos acima descritos, dos pés obtidos pela enxertia com borbulhas do ramo mutante "b", sugere francamente que êste se originou pela duplicação do número de cromossômios. Para provar esta hipótese, realizaram-se contagens de cromossômios em extremidades de raízes de estacas, na meiose e, mais tarde, em fôlhas novas e ramos; determinou-se, igualmente, o tamanho dos estomas, estudando-se também a histologia dos primórdios das fôlhas, fôlhas maduras e de ramos novos.

(*) A diferença entre a média geral (a-1 e a-2) e b-1 é significante ($t=2,71$ para $n=40$ e $P=0,01$).

(**) A diferença entre a mesma média e b-4 é também significante ($t=2,72$ para $n=35$ e $P=0,01$).

A diferença entre b-1 e b-4 não é significante:

Diferença/Erro "standard" = 0,78 ($t=2,76$ para $n=29$ e $P=0,01$).

NÚMERO DE CROMOSÔMIOS NAS PONTAS DE RAÍZES DE ESTACAS

Como já foi dito atrás, contaram-se os cromosômios em pontas de raízes de estacas procedentes dos pés a-1, a-2, b-1 e b-4. Procurou-se, sempre, efetuar contagens em várias camadas do tecido meristemático. Com exceção de dois casos, o mesmo número foi encontrado em tôdas as camadas de uma determinada raiz. Num dêstes casos, verificou-se, aparentemente, a existência de dois núcleos diplóides numa célula rodeada por tecido tetraplóide ($4n=36$) (*), um dos quais se achava em divisão, possibilitando a vista polar de sua metáfase, a contagem de, aproximadamente, 18 cromosômios. Num outro caso foi encontrada uma só célula tetraplóide num tecido inteiramente diplóide.

Excluindo-se as exceções acima mencionadas, foram obtidos os seguintes resultados :

QUADRO III

ÁRVORE	N.º DE ESTACAS EXAMINADAS	N.º DE RAÍZES EXAMINADAS	N.º DE CROMOSÔMIOS
a-1	1	3	$2n=18$
a-2	1	3	$2n=18$
b-1	4	15	$4n=36$
b-4	4	21	$2n=18$

Como era de se esperar, as árvores a-1 e a-2 produziram raízes normais diplóides em suas estacas (fig. 4) ; b-1 deu origem a raízes tetraplóides (fig. 5) e b-4, inesperadamente, tinha, em suas estacas, raízes diplóides.

NÚMERO DE CROMOSÔMIOS NA MEIOSE

Na primavera de 1941, as árvores a-1, b-1 e b-4 produziram pequeno número de botões florais, os quais foram examinados quanto ao seu número de cromosômios na meiose. As contagens foram feitas na M I e A I (**) e, especialmente, na M II e A II. Além disso, fizeram-se observações sobre a presença de "laggards", o número de microsporos derivados de cada microsporocito, e a variabilidade do tamanho do pólen. Os resultados foram os seguintes :

Árvore a-1 : Não pôde ser feita contagem alguma dos cromosômios, mas o número de microsporos de cada microsporocito foi, com

(*) Nesta publicação "n" (=x) foi usado exclusivamente para designar um genômio, não para distinguir entre as condições reduzida (n) e somática (2n).

(**) M, A e T representam, respectivamente, metáfase, anáfase e telófase.

raras exceções, **quatro**, e o pólen era de côr normal e de tamanho uniforme.

Árvore b-1 : O número exato de cromosômios nas diferentes fases da divisão dos microsporocitos apenas pôde ser determinado num limitado número de casos, uma vez que não era possível distinguir nitidamente entre cromosômios uni-bi- e multivalentes. Durante a M I puderam ser observados 14 a 18 bivalentes (aparentes), supondo-se existir grupos multivalentes, quando se contavam menos de 18; na A I vários agrupamentos, dois em cada célula, de 16 a 17 univalentes (aparentes) puderam ser observados; nesta fase, bem como em T I encontraram-se, às vêzes, alguns "laggards"; numa configuração M II, duas placas de, aproximadamente, 14 univalentes foram observadas, notando-se a existência de vários "laggards" distribuídos pelo citoplasma; em vários agrupamentos de A II observaram-se 17 a 18 cromosômios; em duas destas fases, contudo, foram achados grupos de, somente, 9 cromosômios. Apenas 70% de 200 microsporocitos examinados originaram quatro microsporos normais, 0,5% originando **três**, 21,5% **cinco** e 8% **seis** microsporos. Os grãos de pólen maduros eram de vários tamanhos.

Árvore b-4 : Várias contagens em M I mostraram 9 bivalentes (aparentes), dois grupos duvidosos de 9 univalentes em A I, e 9 univalentes em M II e A II. Contudo, em duas primeiras metáfases, aproximadamente, 18 supostos bivalentes foram contados. Dos microsporocitos examinados, 87% deram origem a 4 microsporos e 13% a 5 microsporos; os grãos de pólen eram uniformes em tamanho, talvez um pouco mais variável do que os da árvore a-1.

As tétrades normais encontradas na árvore a-1 indicam que ela provavelmente apenas produz microsporocitos normais diplóides. Os microsporocitos da árvore **b-1** aparentam ser tetraplóides, contudo duas contagens sugerem a possibilidade de que uma pequena parte desta árvore produz microsporocitos diplóides. Os resultados concernentes à árvore b-4 são muito escassos para se tirar uma conclusão definitiva referente à constituição citológica dos seus microsporocitos. Apesar de se tornar muitas vêzes impossível, principalmente em preparações de carmim-acético, determinar a valência dos cromosômios metafásicos de *Citrus*, parece provável que, pelo menos, parte dos microsporocitos da árvore **b-4** seja diplóide. Duas contagens de cromosômios e 13% das contagens de microsporos, entretanto, sugerem tetraploidia. Devemos ter em conta que o número de botões examinados e de contagens de cromosômios efetuadas foi reduzido, em virtude de os tetraplóides de *Citrus* florescerem, em geral, menos que os diplóides. Por êsse motivo,

as contagens de cromossômios não devem ser consideradas suficientes para desprezar as provas histológicas de que, pelo menos, parte da segunda camada geratriz hipodermal é tetraplóide na árvore b-4. Evidentemente, esta árvore, como acontecera para o galho mutante do qual se originou, não possui camadas geratrizes idênticas em tôdas as suas partes. A existência de diferenças genéticas (citológicas) numa mesma camada geratriz, aqui verificada, está de acôrdo com a acentuada variabilidade de outras formas de *Citrus* conhecidas como sendo quimeras periclinais. Por exemplo, a famosa "bizarria" descrita por Nati, há 300 anos atrás, que se originou no ponto de união de um enxêrto entre cidra e laranja azêda, produz, muitas vêzes, frutos inteiros ou setores em que uma das espécies, das quais se compõe a quimera, se acha inteiramente ausente.

TAMANHO DOS ESTOMAS

Por meio de uma ocular micrométrica foram feitas medições da área dos estomas sob pequeno aumento; para êste fim prepararam-se cortes, à mão livre, da epiderme inferior, sendo dois de cada lado da nervura principal, no setor central de 10 fôlhas, colhidas ao acaso, da face sul das 3 árvores enxertadas, fixando-as, a seguir, numa solução de formalina, ácido acético e álcool 50% (5-5-90); as secções foram analisadas sem colorí-las; de cada fôlha mediram-se 20 estomas, cerca de 5 de cada secção, periferando, assim, um total de 200 para cada árvore. A área de cada estoma foi calculada, multiplicando-se o produto comprimento x largura da área ocupada pelas duas células protetoras por $\pi/4$, julgando-se que esta área tenha a forma de uma elipse. A variância "entre" e "dentro" das fôlhas foi calculada para cada árvore, usando-se para a interpretação dos resultados obtidos a tabela de 3 de Brieger (3). Esta análise revelou que as varianças encontradas não apresentaram diferenças significantes. Em consequência disso, a variabilidade total da área dos estomas de cada árvore foi utilizada para estimativa do erro "standard" da média geral da área de estomas. As médias e os seus erros "standard" se acham reunidos no quadro IV.

QUADRO IV

ÁREA MÉDIA DOS ESTOMAS EM UNIDADES DA OCULAR MICROMÉTRICA (*)

ÁRVORE	N.º DE ESTOMAS	ÁREA EM UNIDADES QUADRADAS		
		Médias	Diferenças	Dif. E. S.
a-1	200	94.42 ± 1.09		
b-1	200	106.38 ± 0.97	11.96	8,19(**)
b-4	200	93.76 ± 0.87	0.66	0.47(***)

Apesar do fato de a análise estatística acima revelar diferenças significantes entre as médias dos estomas das árvores a-1 e b-1 e também entre as plantas b-1 e b-4, conclue-se que estas diferenças devem ser atribuídas a algum fator do meio ambiente, e não à duplicação do número de cromossômios, porquanto elas não estão de acordo com as contagens de cromossômios efetuadas na epiderme de primórdios de folhas, como será demonstrado mais adiante, e que revelaram que esta camada celular é **diplóide** para todas as três árvores; elas também estão em desacordo com as observações sobre a espessura das células da epiderme de folhas maduras, que é igual nas três árvores. Investigações feitas no Instituto Agrônomo (12) revelaram que as diferenças entre as áreas médias dos estomas entre formas diplóides e tetraplóides de *Citrus*, tendo-se derivado estas daquelas pela duplicação dos cromossômios, são cerca de 4 vezes maiores do que as encontradas entre os pés a-1 e b-1 (quadro IV).

PRIMÓRDIOS DAS FOLHAS

O material colhido e seccionado permitiu o estudo histológico e a determinação do número de cromossômios em diferentes camadas celulares não somente em primórdios muito novos de folhas, como também em fases mais adiantadas, quando a lâmina foliar já se achava parcialmente desenvolvida. Primórdios muito novos de folhas apareceram,

(*) A área dos estomas em microns quadrados pode ser obtida multiplicando-se esta média por 2,89, porquanto cada unidade da ocular micrométrica corresponde a 1,7 microns.

(**) A diferença entre as médias de a-1 e b-1 é altamente significativa.

(***) A diferença entre as médias de a-1 e b-4 não é significativa. A diferença entre as médias de b-1 e b-4 é também muito significativa (Dif. E. S. = 9,71) ($t=2,60$ para $n=200$ e $P=0,01$).

nos cortes transversais, em forma de discos, sendo apenas constituídas por algumas camadas, mais ou menos concêntricas, de células. Um pouco mais tarde, aparecem duas protuberâncias, uma de cada lado, que dão origem à lâmina da folha. Neste estágio, o sistema vascular da nervura central inicia o seu desenvolvimento; em alguns cortes transversais também puderam ser observadas zonas do procâmbio da lâmina, que se acham ligadas com o tecido vascular da nervura central. A diferenciação dos tecidos esponjoso e paliádico ocorre bem mais tarde.

As seguintes diferenças foram notadas nos cortes das três árvores examinadas:

a-1 (figs. 6a. e 7a.) — Em secções transversais circulares, as células da epiderme são, aproximadamente, do mesmo tamanho que as internas. Em estágios mais adiantados, devido ao fato de a epiderme se transformar numa camada mais bem organizada, as células geralmente se tornam um pouco mais compridas em direção radial, aparecendo, então, um pouco menores que as demais. As células do tecido parenquimatoso do lado dorsal da nervura central se tornam bem maiores que as da epiderme. As células do procâmbio, em secções transversais da lâmina, são estreitas e alongadas, contendo citoplasma fortemente colorido. No material de **a-1**, como era esperado, encontraram-se $2n=18$ em tôdas as camadas examinadas.

b-1 (figs. 6b e 7b) — O desenvolvimento dos primórdios das folhas é, naturalmente, idêntico ao verificado para **a-1**; as diferenças, entretanto, no tamanho das células, são as seguintes: a sub-epiderme e camadas adjacentes são formadas por células, as quais, desde o início, se apresentam bem maiores do que as células da epiderme; esta diferença se torna ainda mais evidente quando se compara a epiderme com o tecido parenquimatoso adjacente na face dorsal da nervura central de folhas um pouco mais velhas; a diferença do tamanho é aqui bem mais notável do que na árvore **a-1**. As células do procâmbio, pelo contrário, não parecem diferir, em tamanho, daquelas examinadas no pé **a-1**. Extensas investigações com a finalidade de determinar o número de cromossomos nas diferentes camadas celulares destes cortes transversais revelaram que a epiderme é diplóide ($2n=18$), a sub-epiderme e camadas adjacentes são tetraplóides ($4n=36$) e as células do procâmbio também tetraplóides ($4n=36$).

b-4 (figs. 6c, 7c e 8a, b) — Após cuidadoso exame chegou-se à conclusão de que não existem diferenças apreciáveis quanto ao tamanho e à estrutura das células dos primórdios das folhas entre os pés **b-4** e



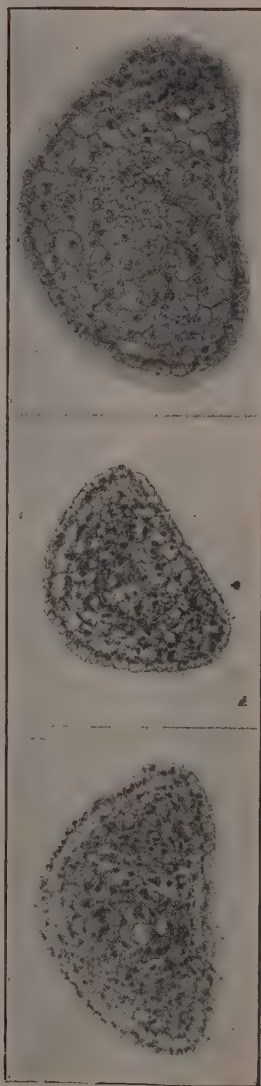
Fig. 5

Cromossomos metafásicos em ponta de raiz de uma estaca procedente da árvore b-1 ($4n=36$) x 3.900.

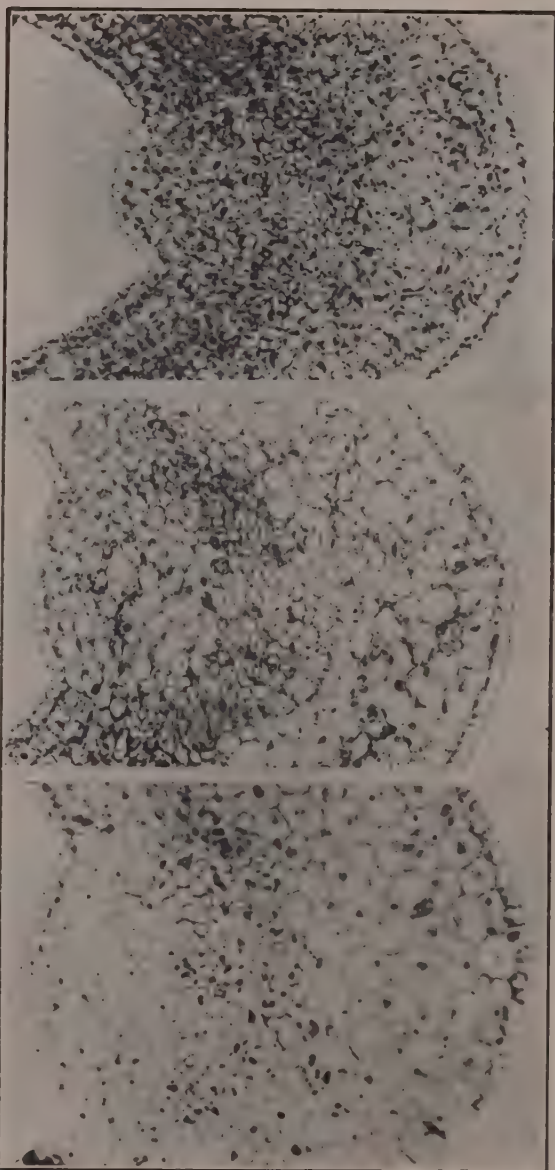


Fig. 4

Cromossomos metafásicos em ponta de raiz de uma estaca procedente da árvore a-1 ($2n=18$) x 3.900.



a — da árvore a-1 b — da árvore b-1 c — da árvore b-4
Fig. 6 — Seções transversais de primórdios de folhas (x 200).

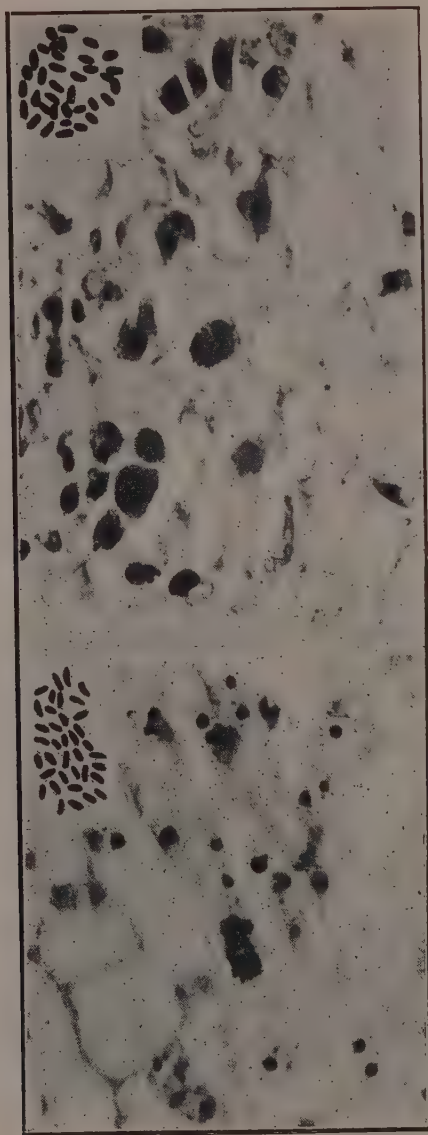


a — da árvore a-1

b — da árvore b-1

c — da árvore b-4

Fig. 7 — Seções transversais da região da nervura central de folhas novas ($\times 200$).



a — $4n=36$ no procâmbio da lâmina da folha b — $4n=36$ no procâmbio da região da nervura central
Fig. 8 — Células do procâmbio de folhas novas da árvore b-4 ($\times 1.000$).



a — da árvore a-1

b — da árvore b-1

c — da árvore b-4

Fig. 9 — Seções transversais da região da nervura central de folhas maduras (x 50).



a — da árvore a-1

b — da árvore b-1

c — da árvore b-4

Fig. 10 — Cortes transversais de lâminas de folhas maduras (x 50).

Fig. 11a

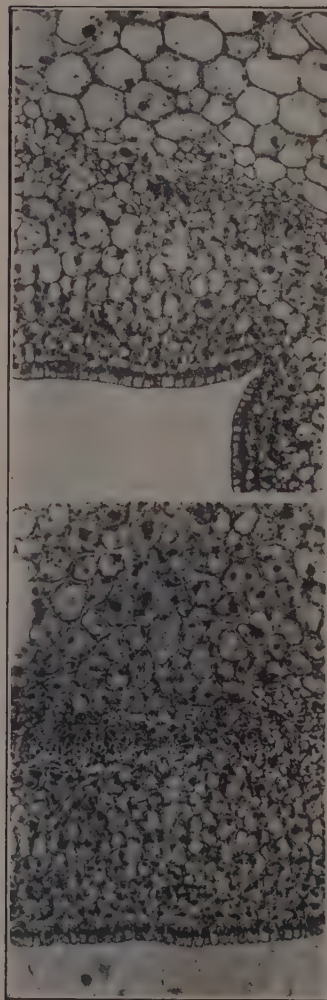


Fig. 11b

Fig. 11c

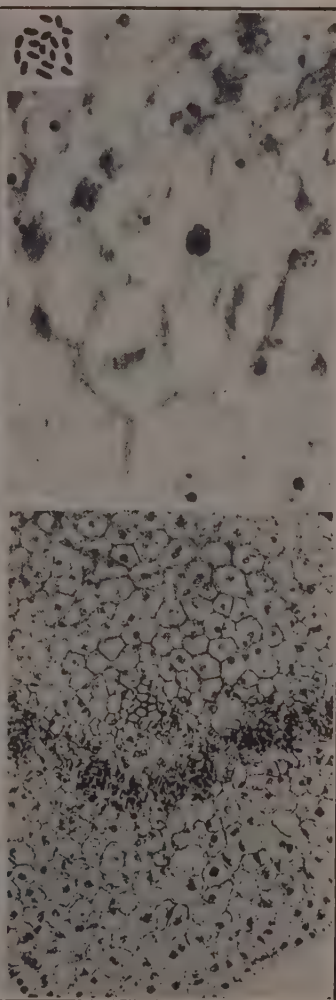


Fig. 12

Fig. 11 — Cortes transversais de extremidades de ramos novos (x 200).

a — da árvore a-1

b — da árvore b-1

c — da árvore b-4

Fig. 12 — Setor da medula e do procâmbio de um ramo novo da árvore b-4; $2n = 18$ (x 1.000).

b-1; a constituição cromossômica das diversas camadas de células foi a mesma, isto é, $2n=18$ na epiderme; as camadas adjacentes e o procâmbio são tetraplóides ($4n=36$).

Fôlhas maduras (figs. 9a, b, c e 10a, b, c)

O estudo de cortes transversais efetuados através da porção central de fôlhas maduras, inclusive a nervura central e partes da lâmina, revelou os seguintes dados: a epiderme é constituída por células de, aproximadamente, mesmo tamanho nas três árvores, a-1, b-1 e b-4; o parênquima do tecido paliçádico é notadamente mais largo em b-1 e b-4 do que em a-1, sendo as suas células, em média, mais compridas e largas nos dois primeiros; o parênquima esponjoso ocupa maior espaço e suas células são maiores em b-1 e b-4 do que em a-1. Na região da nervura central, o tecido parenquimatoso, paliçádico e esponjoso, é bem mais desenvolvido em b-1 e b-4 do que em a-1; no tecido vascular, os vasos, as traquéias, etc., apresentam, aparentemente, um diâmetro maior em b-1 e b-4 do que em a-1. Não foi possível notar quaisquer diferenças no tamanho das células entre o material examinado dos pés b-1 e b-4.

Ramos novos (figs. 11a, b, c e 12)

Examinaram-se, ainda, cortes transversais das extremidades de ramos novos. As células da epiderme foram encontradas como apresentando o mesmo tamanho nas três plantas examinadas a-1, b-1 e b-4. O córtex é constituído por células maiores nos pés b-1 e b-4 do que em a-1. Nestes brotos novos não puderam ser encontradas diferenças quanto ao tamanho das células do procâmbio e do tecido vascular, cujo desenvolvimento se inicia nesta região. Em material procedente dos pés a-1 e b-1 notou-se uma considerável diferença no tamanho entre as células da medula e do córtex, tendo a primeira células de tamanho quase o dobro que este último; no pé b-4, entretanto, a diferença do tamanho das células destas duas regiões era insignificante, sendo tôdas as células, aproximadamente, do mesmo tamanho. As seguintes contagens de cromossômios foram efetuadas: a epiderme era diplóide para os três pés, como era esperado; as células parenquimatosas do córtex eram tetraplóides para b-1 e b-4, sendo diplóides apenas para a-1; o procâmbio e as células da medula dos pés a-1 e b-4 eram diplóides, sendo estes tecidos tetraplóides apenas para b-1.

DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

Os resultados das investigações atrás relatadas indicam que o galho original mutante, encontrado em um dos enxertos derivados de uma tangerina híbrida (King x Dancy), deve os seus caracteres especiais à

duplicação somática dos cromosômios e produziu gemas de, pelo menos, dois tipos de constituição citológica. Ambos são quimeras periclinais e, considerando-se que três camadas geratrizes tomam parte no desenvolvimento do brôto vegetativo em *Citrus*, como ocorre em *Datura* (1, 2, 18, 19), tais quimeras são da seguinte constituição : uma é $2n-4n-4n$, respectivamente para a primeira, segunda e terceira camada geratriz, dando origem à planta b-1 ; outra, produzindo a árvore b-4, é de constituição $2n-4n-2n$ para as mesmas camadas. Não se poderá determinar em que época se processou esta duplicação : se numa gema da planta híbrida original, ou, ainda antes, durante a sua ontogenia ; também não é possível saber-se de que maneira ocorreu a diferenciação entre estas duas quimeras.

As contagens de cromosômios para a planta b-4 indicam que ela produz alguns microsporocitos diplóides ; existem, também, indicações de que apenas uma pequena parte da segunda camada geratriz desta árvore mudou para a condição diplóide.

Com base na constituição citológica destas duas quimeras, podem ser apresentadas as seguintes considerações : a primeira camada geratriz apenas toma parte na formação da epiderme ; diferenças no tamanho dos estomas entre os dois indivíduos, apesar de serem de significação estatística, não representam sempre uma indicação da existência de diferenças do número de cromosômios na epiderme. Por êsse motivo devemos tomar cuidado ao fazer deduções quanto à constituição cromossômica desta camada, baseando-nos apenas no tamanho dos seus estomas.

A segunda camada geratriz é responsável pela formação do tecido interno da fôlha, inclusive o procâmbio e o tecido vascular, como foi claramente demonstrado por contagens de cromosômios no procâmbio de primórdios das fôlhas da planta b-4, cuja segunda camada geratriz apenas é tetraplóide.

A semelhança na grossura e na forma das fôlhas, esta última revelada pelos respectivos índices (tabela 1 e 2), constitui uma segunda prova de que a constituição citológica das fôlhas das plantas b-1 e b-4 é idêntica. Êste fato não está de acôrdo com as conclusões de Satina e Blakeslee (19), porquanto no gênero *Datura* o tecido vascular das fôlhas é derivado da terceira camada.

O fato de as fôlhas destas quimeras serem idênticas e se assemelharem muito às fôlhas de plantas tetraplóides puras, apesar de possuírem uma epiderme diplóide, constitui uma indicação do papel preponderante que a segunda camada geratriz exerce na formação das fôlhas de *Citrus*.

As camadas de células, localizadas abaixo da epiderme em ramos novos (córtex), também são derivadas da segunda camada. Como acontece com outras plantas, esta camada é responsável pela formação dos microspórofitos. Como é ela tetraplóide nas duas quimeras em questão, torna-se responsável pela falta relativa de frutificação, característica das formas cítricas tetraplóides.

Todos os tecidos derivados do procâmbio e mais tarde do câmbio do caule e também sua medula se originam da terceira camada geratriz. O fato de ser esta camada diplóide numa das quimeras (b-4) e tetraplóide na outra (b-1) provavelmente constitui a explicação por que essas duas árvores tanto diferem no seu hábito de crescimento; b-4 sendo alta e ereta e mais ou menos idêntica no seu formato à planta a-1, b-1, pelo contrário, é curta e de copa larga. Se esta hipótese for confirmada, poder-se-á concluir que a terceira camada geratriz tem um papel importante na determinação do hábito de crescimento das árvores. Contagens de cromossomos, em pontas de raízes de estacas das duas quimeras, provaram que as raízes que se desenvolvem de um calo são sempre derivadas da terceira camada geratriz. Observou-se, também, que o calo, na base das estacas, se desenvolve abaixo da casca e parece originar-se somente do câmbio fascicular.

Verificou-se que a largura das folhas é mais estreita, nas duas quimeras em questão, do que em 11 formas cítricas, provavelmente tetraplóides puras, que têm sido estudadas na Citrus Experiment Station; esta diferença talvez possa ser atribuída à natureza diplóide da epiderme dessas quimeras.

Na árvore b-4, como já foi dito atrás, o tecido vascular das folhas é tetraplóide, sendo, porém, diplóide, o tecido correspondente no caule. Considerando-se que, de acordo com vários investigadores, as células procambiais nos primórdios das folhas se diferenciam em duas direções — para cima em direção ao ápice da folha e para baixo em direção ao ápice do brôto — para formar os traços foliares verticais, poder-se-á concluir que, na árvore b-4, os vasos das folhas tetraplóides provavelmente se unem com os vasos diplóides do caule na região da inserção do pecíolo.

Uma vez que ambas as quimeras se originaram pela duplicação somática natural dos cromossomos, e considerando-se ainda que elas não podem ser facilmente distinguidas, pelos seus caracteres morfológicos, dos tetraplóides puros, conclui-se que bastante cuidado deve ser tomado na separação de "seedlings" tetraplóides de *Citrus* destinados às investigações citogenéticas e aos trabalhos de melhoramento.

A evidência, entretanto, indica que árvores tetraplóides parciais são provavelmente muito raras.

Há necessidade de serem efetuados novos estudos sobre as camadas geratrizes em *Citrus*, principalmente com referência à provável existência de apenas duas camadas geratrizes responsáveis pela ontogenia da folha, como indicam as investigações atrás. Compete ainda determinar qual a função destas camadas geratrizes na formação do pistilo e do fruto, estruturas tão complexas sob o ponto de vista morfológico. Não é fácil explicar como apenas duas camadas geratrizes podem existir em folhas como aquelas encontradas, por Shamel (21), no limão variegado, considerando-se que essas folhas possuem uma margem branca, uma parte interna variegada, devendo, portanto, possuir em sua epiderme dois tipos genéticos diversos (9).

SUMÁRIO

A investigação atrás relatada trata da natureza citológica de um mutante somático que se originou num enxerto de tangerina híbrida (King x Dancy). Do ramo mutante obtiveram-se vários enxertos que foram comparados com outros enxertos procedentes da parte normal da árvore. Os resultados de uma detalhada investigação indicam que os enxertos procedentes de ramo mutado se compõem, no mínimo, de dois tipos de constituição quimérica: um é $2n-4n-4n$, respectivamente, para a primeira, segunda e terceira camada geratriz, e outro $2n-4n-2n$, para as mesmas camadas.

Admitindo-se a existência de 3 camadas geratrizes em *Citrus*, demonstrou-se que a primeira camada geratriz forma a epiderme, a segunda todo o tecido das folhas (com exceção da epiderme), os microsporocitos e, no mínimo, uma parte do córtex de brotos vegetativos novos, e a terceira o procâmbio, câmbio e a medula do caule. As contagens do número de cromossomos em pontas de raízes de estacas dessas duas quimeras demonstraram que tais raízes, pelo menos, quando se derivam de um calo, têm origem na terceira camada geratriz. Comparações do tamanho de estomas de folhas maduras, de diferentes plantas, indicam que as diferenças de tamanho, mesmo quando estatisticamente significantes, não são sempre relacionadas com diferenças no número de cromossomos na epiderme. Os enxertos destas duas quimeras diferem consideravelmente no seu hábito de crescimento; os que possuem uma terceira camada geratriz diplóide têm um hábito de crescimento normal (ereto), possuindo os outros uma terceira camada tetraplóide,

sendo baixos e de copa larga. Êste fato sugere que a terceira camada exerce um papel considerável na determinação do hábito de crescimento das árvores. Ambas as quimeras são pouco produtivas, o que é típico para os tetraplóides de *Citrus*.

AGRADECIMENTOS

Os autores desejam expressar os seus agradecimentos ao sr. A. J. T. Mendes, pelo auxílio que lhes prestou durante o estudo final dos cortes transversais de fôlhas e ramos e também durante a preparação das microfotografias.

SUMMARY

The present investigation deals with the cytological nature of a bud variant which originated on a progeny tree of a hybrid mandarin (King x Dancy). From the variant branch several progeny trees were grown in comparison with others derived from the normal part of the tree. The results of extensive investigation indicate that the budded progeny of the variant branch includes at least two types of chimeral constitution: one is $2n-4n-4n$ respectively for its first, second, and third germ layers, and the other is $2n-4n-2n$ for the same layers.

On the assumption that three germ layers exist in *Citrus*, it was demonstrated that the first germ layer forms the epidermis, the second one all leaf tissues (with the exception of the epidermis), the microsporocytes and at least part of the cortex of young vegetative shoots, and the third one forms the procambium, cambium, and the pith of the stem. Determination of chromosome number in root tips of cuttings of these two chimeras, demonstrated that these roots, at least when they derive from a callus, have their origin in the third germ layer. Comparison of stomata of mature leaves of different plants indicates that size differences, even if they are of statistical significance, are not always due to differences in chromosome number in the epidermis. The progeny trees of these chimeras differ considerably in growth habit, the one with a diploid third germ layer being approximately normal (erect), the other with a tetraploid third layer being low and broad. This fact suggests that the third layer plays a considerable role in determining the growth habit of the trees. Both chimeras are rather unfruitful, which is typical for *Citrus* tetraploids.

LITERATURA CITADA

1. Blakeslee, A. F., A. D. Bergner, S. Satina e E. W. Sinnott. Induction of periclinal chimeras in *Datura stramonium* by colchicine treatment. Science 89 : 402. 1939.
2. Blakeslee, A. F. Effects of induced polyploidy in plants. Amer. Nat. 75 : 117-135. 1941.
3. Brieger, F. G. Tábuas e fórmulas para estatística. Comp. Melhoramentos, S. Paulo. 1937.
4. Foster, A. S. Leaf differentiation in angiosperms. Bot. Rev. 2 (7) : 349-372. 1936.
5. Foster, A. S. Problems of structure, growth and evolution in the shoot apex of seed plants. Bot. Rev. 5 : 454-470. 1939.
6. Frost, H. B. Tetraploidy in *Citrus*. Proc. Nat. Acad. Sci. Wash. 11 : 535-537. 1925.

7. **Frost, H. B.** Polyembryony, heterozygosis, and chimeras in *Citrus*. *Hilgardia* 1 : 365-402. 1926.
8. **Frost, H. B.** The genetics and cytology of *Citrus*. Current Science, Special Number on "Genetics". 1938.
9. **Frost, H. B.** Genetics and breeding. Chap. 9 in Webber, H. J., et al., *The Citrus Industry*, Vol. I. 1943.
10. **Goulden, C. H.** Methods of statistical analysis. 277 pp. New York : John Wiley and Sons. 1939.
11. **Johansen, D. A.** Plant microtechnique. 523 pp. New York and London : McGraw-Hill. 1940.
12. **Krug, C. A. e O. Bacchi.** Observações citológicas em *Citrus*. V. Poliploidia em relação à densidade e ao tamanho dos estomas em *Citrus* e outros gêneros das *Aurantioideæ*. *Bragantia* 4 : 429-448, fig. 1, grát. 1-3. 1944.
13. **Lapin, W. K.** Investigations on polyploidy in *Citrus*. (In Russian, English summary). U.S.S.R. All-Union Sci. Res. Inst. Humid Subtropics Works 1 (4) : 1-68. 1937.
14. **Nakamura, M.** Cytological studies in the genus *Citrus*. I. On the Wase Satsuma originated through bud variation. (Japonês, Sumário em inglês). Tanaka Citrus Expt. Sta., Japan. *Studia Citrologica* 3 : 1-14. 1929.
15. **Oppenheim, J. D.** On the origin of the "Jaffa Orange". *Hadar* 2 : 31-33. 1929.
16. **Oppenheim, J. D. e O. H. Frankel.** Investigations into the fertilization of the "Jaffa Orange". I. *Genetica* 11 : 369-374. 1929.
17. **Randolph, L. F.** A new fixing fluid and a revised schedule for the paraffin method in plant cytology. *Stain Tech.* 10 : 85-86. 1935.
18. **Satina, S., A. F. Blakeslee e A. G. Avery.** Demonstration of the three germ layers in the shoot apex of *Datura* by means of induced polyploidy in periclinal chimeras. *Amer. J. Bot.* 27 : 895-905. 1940.
19. **Satina, S. e A. F. Blakeslee.** Periclinal chimeras in *Datura stramonium* in relation to development of leaf and flower. *Amer. J. Bot.* 28 : 862-871. 1941.
20. **Schmidt, A.** Histologische Studien an phanerogamen Vegetationspunkten. *Bot. Arch.* 8 : 345-404. 1924.
21. **Shamel, A. D.** A pink-fruited lemon. *J. Hered.* 23 : 23-27. 1932.
22. **Shamel, A. D., C. S. Pomeroy e R. E. Caryl.** Bud selection in the Washington Navel orange. Progeny tests of the Thomson, Washington, Corrugated and Golden Buckeye strains originating as limb variations on a single tree *J. Hered.* 16 : 232-241. 1925.
23. **Shamel, A. D., C. S. Pomeroy e R. E. Caryl.** Bud selection in Eureka and Lisbon lemons and progeny tests of bud variations. U. S. Dept. Agric. Tech. Bull. 531 : 1-43. 1936.
24. **Tanaka, Tyôzaburô.** A monograph of the Satsuma orange, with special reference to the occurrence of new varieties through bud variation. *Mem. Taihoku Imp. Univ. Faculty Sci. and Agric.* 4 : 1-626. 1932.
25. **White, O. E.** Swingle on variation in F1 *Citrus* hybrids and the theory of zygotaxis. *Amer. Nat.* 48 : 185-192. 1914.

COMPÓS E IMPRIMIU
INDÚSTRIA GRÁFICA SIQUEIRA
Salles Oliveira & Cia. Ltda.
RUA AUGUSTA, 235 - SÃO PAULO

SECÇÕES TÉCNICAS

Secção de Agro-Geologia: — J. E. de Paiva Neto, Marger Gutmans, Mário Seixas Queiroz, José Setzer, Luiz Antônio Maciel, Alcir Cesar do Nascimento, Alfredo Kupper, Renato Almicare Catani.

Secção de Botânica: — A. P. Viégas, Coaraci M. Franco, A. Sousa Lima, Paulo V. C. Bittencourt, Alcides Ribeiro Teixeira, Luiza Cardoso.

Secção de Café: — J. E. Teixeira Mendes, Antônio J. Sousa, João Aloisi Sobrinho, Romeu Inforzato.

Secção de Cereais e Leguminosas: — Gláuco Pinto Viégas, Neme Abdo Neme, H. Silva Miranda, Heitor de Castro Aguiar, Paulo Bruhms Filho, Milton Alcovér.

Secção de Fumo e de Plantas Inseticidas e Medicinais: — Abelardo Rodrigues Lima, S. Ribeiro dos Santos, Ademar Jacob, Edmar J. Kiehl.

Secção de Cana de Açúcar: — José Vizioli, Sebastião de Campos Sampaio, C. de Castro Neves.

Secção de Oleaginosas: — Pedro T. Mendes, Otacílio Ferreira de Sousa, Joaquim Bento Rodrigues.

Secção de Química Mineral: — Otávio Sáes, João B. C. Neri Sobrinho, Afonso de Sousa Gomide.

Secção de Raízes e Tubérculos: — J. Bierrenbach de Castro, Edgard S. Normanha, A. P. Camargo, Olavo J. Boock, Araken Soares Pereira.

Secção de Tecnologia Agrícola: — Augusto Frota de Sousa, Francisco A. Correia, Flávio Beltrame, José Pio Neri, Ari de Arruda Veiga.

Secção de Fisiologia e Alimentação das Plantas.

Secção de Tecnologia de Fibras.

Secção de Técnica Experimental e Cálculos.

ESTAÇÕES EXPERIMENTAIS

Boracéia:

Central de Campinas:

Ubatuba:

Jundiaí: — E. Palma Guimarães.

Limeira: — A. J. Rodrigues Filho.

Pindorama: — Rubens A. Bueno.

Piracicaba: — Homero C. Arruda.

Ribeirão Preto: — Roberto Rodrigues, O. Augusto Mamprim, Antônio Gentil Gomes.

São Roque: — J. Seabra Inglês de Sousa.

Sorocaba: — Orlando A. Figueiredo.

Tatui: — José Moreira Sales.

Tietê: — Miguel A. Anderson.

Tupí: — Argemiro Frota.

SUB-ESTAÇÕES EXPERIMENTAIS

Capão Bonito — José Moreira Sales.

Mococa — Lineu C. Sousa Dias.

Jaú

Pederneiras { Hélió de Moraes.

Santa Rita — Manoel Saraiva Júnior.

Monte Alegre — Vicente Gonçalves de Oliveira.

Pindamonhangaba —

S. Bento do Sapucaí —

COMPÓS E IMPRIMI
INDÚSTRIA GRÁFICA SIQUEIRA
Salles Oliveira & Cia. Ltda
RUA AUGUSTA, 235 - SÃO PAULO